الجمهورية العربية السورية
جامعة حلب
كلية الزراعـــــة
قسم وقايــة النبات



"تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر ***Rhizoctonia solani*** **Kühn.** على البطاطا في سورية والتدابير الممكنة لإدارة المرض الذي يحدثه"

"Identification of Anastomosis Groups within Population of *Rhizoctonia solani* Kühn affecting potatoes in Syria and Potential Measures for Management of the Disease it Causes"

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية
(وقاية النبات)

إعداد
المهندسة الزراعية رانيا حاج عبدو

بإشراف

الأستاذ الدكتور بسام بياعة
كلية الزراعة – جامعة حلب

الدكتور عباس عباس
المؤسسة العامة لإكثار البذار

العام الدراسي 2010–2011

ACKNOWLEDGEMENT كـلـمـة شكر

لا يسعني في نهاية هذه المشوار العلمي إلا أن أتوجه بأخلص معاني الشكر والعرفان لكل من مدّ لي يد العون في إكمال هذا العمل وإنجازه كي يرى النور. وأخص بالشكر:

- رئاسة جامعة حلب ممثلة بالأستاذ الدكتور **نضال شحادة**، وعمادة كلية الزراعة ممثلة بالأستاذ الدكتور **محمد نبيل شلبي** لبذلهما كل الجهود الممكنة في سبيل دعم البحث العلمي وتطوره، وكذلك قسم وقاية النبات ممثلاً بالأستاذ الدكتور **أمين حاج قاسم** رئيس القسم لكل ما وفره من تسهيلات ساعدت في تمهيد الطريق أمام نجاح هذا العمل.
- لجنة الحكم الممثلة بالأستاذ الدكتور **بسام بياعة** والأستاذ الدكتور **محمد ابو شعر** والأستاذ الدكتور **محمود حسن** لمراجعة الأطروحة وتكبده عناء السفر وملاحظاتهم القيمة التي أغنت الأطروحة.
- المشرفين على هذا البحث الأستاذ الدكتور **بسام بياعة** الذي له الدور الأكبر في توجيه خطوات البحث وتقديم الدعم والنصائح العلمية والمعنوية. ومهما كتبت فلن أحيط بما قدم لي من خبرات وكان بمثابة قدوة أحتذي بها في كافة مجالات الحياة والدكتور **عباس طالب عباس** الذي زودني بوافر خبرته وجزيل عونه.
- المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA) ممثلاً بالدكتور **محمود الصلح** المدير العام ونائبه الدكتور **مجد جمال** لرعاية قسم الدراسة الجزيئية لهذا البحث
- الدكاترة مايكل باوم والأخين سامر لبابيدي وعلاء حموية الذين قدموا لي الدعم لإكمال هذا العمل وإتمامه ولم يبخلوا في أي مساعدة علمية ومعنوية؛ وفريق العمل في مخابر التقانة الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة.
- السيد عامر جنيدان، مهندس في مختبر تقانة الأحياء في كلية الزراعة
- كل من قدم لي الدعم لإكمال وإتمام هذا العمل ولم يبخل في أي مساعدة علمية ومعنوية وأخص بالذكر الدكتور عبد الرحمن كلحوت، الدكتور موفق يبرق، الدكتور خالد قاسم والمهندس حجازي مندو من البحوث العلمية، حلب؛ الدكتور عبد المحسن السيد عمر، الدكتور بسام سليمان، المهندس محمد عبد الهادي، المهندس شادي سنكري وكادر مختبرات الأنسجة من المؤسسة العامة لإكثار البذار؛ والمهندس عمار بياعة من كلية الزراعة
- وفي نهاية هذا الطريق أتقدم بأخلص معاني العرفان بالجميل **لأسرتي** التي أحاطتني بوافر المحبة والحنان ومدتني بجزيل العون والدعم والمعنوي مما ساعدني في تحقيق الهدف من هذا البحث كخطوة أولى في مجال التحصيل للدرجات العلمية العليا.

رانيا

الإهداء

إلى صاحب القلب الكبير...والدي

إلى الصدر الحنون.............فيرو

من شاطرني حلو الحياة ...... محمد

من درجت قبلي وكونت أسرة

توانا وماغا

رانيا

تـصريـح

أصرح بأن هذا البحث بعنوان:

"تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn. على البطاطا في سورية والتدابير الممكنة لإدارة المرض الذي يحدثه"

"Identification of Anastomosis Groups within Population of *Rhizoctonia solani* Kühn affecting potatoes in Syria and Potential Measures for Management of the Disease it Causes"

لم يسبق أن قبل للحصول على أية شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى

المرشحة

رانيا حاج عبدو

DECLARATION

I hereby certify that this work:

"Identification of Anastomosis Groups within Populations of *Rhizoctonia solani* Kühn affecting potatoes in Syria and Potential Measures for Management of the Disease it Causes"

Has not been accepted for any degree or it is not submitted to any other degree.

Candidate

Rania Haj Abdo

شهـا د ة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة رانيا حاج عبدو بإشراف الأستاذالدكتور بسام بياعة الأستاذ في قسم وقاية النبات من كلية الزراعة بجامعة حلب والدكتور عباس طالب عباس رئيس مختبر جودة البذور من المؤسسة العامة لإكثار البذار

إن أية مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص هذه الرسالة.

رانيا حاج عبدو　　　　أ.د. بسام بياعة　　　　د. عباس طالب عباس

CERTIFICATE

We herein certify that the work described in this thesis is the result of scientific search conducted by the candidate Rania Haj Abdo under the supervision of Doctor Bassam Bayaa, Professor of Phytopathology at the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Aleppo, and Dr Abbas T. Abbas Head of Seed Quality Lab at the General Organization for Seed Multiplication, Aleppo

Rania Haj Abdo　　　　**Dr. Abbas T. Abbas**　　　　**Dr. Bassam Bayaa**

"تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر .*Rhizoctonia solani* Kühn على البطاطا في سورية والتدابير الممكنة لإدارة المرض الذي يحدثه"

"Identification of Anastomosis Groups within Population of *Rhizoctonia solani* Kühn Affecting Potatoes in Syria and Potential Measures for Management of the Disease it Causes"

نوقشت هذه الرسالة وأجيزت بتاريخ 26 /06/ 2011 م.

أعضاء لجنة الحكم

الأستاذ الدكتور بسام بياعة

الأستاذ الدكتور محمود حسن

الأستاذ الدكتور محمد أبو شعر

فهرس المحتويات

الفصل الأول

(مقدمة، أهداف البحث، دراسة مرجعية عامة)

الفصل الثاني

حصر انتشار مرض القشرة السوداء الذي يحدثه الفطر *R. solani* وتوزيعه في المناطق الرئيسية لزراعة البطاطا في سورية

الفصل الثالث

تحديد المجموعات التشابكية AGs للفطر *R. solani* في المناطق المدروسة بطريقة تشابك الهيفا وبالطرائق الجزيئية

الفصل الرابع

عزل الكائنات الدقيقة، البكتيرية والفطرية، التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *R. solani* المحدث لمرض القشرة السوداء على البطاطا

الفصل الخامس
المكافحة الكيميائية

الفصل السادس

الإسهام في وضع خطة متكاملة لمكافحة المرض باستخدام الكائنات المضادة (مكافحة أحيائية) والمبيدات الكيميائية للفطور (مكافحة كيميائية)

الفصل السابع
الاستنتاجات والتوصيات

فهرس الجداول

فهرس الأشكال

الفصل الأول
(مقدمة، أهداف البحث، دراسة مرجعية عامة)

1. مقدمة

تعدّ البطاطا/ البطاطس *Solanum tuberosum* L. من المحاصيل الرئيسة المهمة، وتزرع أصنافها المتنوعة في مناطق وظروف مناخية مختلفة من العالم (Potato news, 2004; Van der Zaag, 1991). وهي تنتمي إلى العائلة الباذنجانية *Solanaceae* (الورع، 1977). ويضم الجنس *Solanum* حوالي 2000 نوع، تنمو في ظروف بيئية متنوعة من درجات الحرارة، والرطوبة، والإضاءة، وفي تربٍ مختلفة (Van der Zaag, 1991). الموطن الأصلي للبطاطا هو أمريكا الجنوبية (البيرو وتشيلي وبوليفيا)، حيث ازدهرت زراعتها هناك منذ أكثر من 400 سنة، وكان المستكشفون الإسبان أول الأوروبيين الذين أكلوا البطاطا. (من الموقع على الشبكة الإلكترونية: (Http://42explore.com/potato.htm)

تأتي أهمية البطاطا من كونها محصولاً غذائياً رئيساً لا يتفوق عليها، من حيث الإنتاج العالمي للاستهلاك البشري، سوى محاصيل القمح والذرة والأرز. وهي تستخدم بشكل كبير في تغذية الإنسان وعلف الحيوانات، والاستعمالات الصناعية. وللبطاطا قيمة غذائية عالية حيث تحتوي درناتها على 78% ماء، وحوالي 18% نشاء (كربوهيدرات)، والباقي بروتينات ومواد معدنية و0.1% مواد دهنية. كما تحتوي درناتها على عديد من الفيتامينات المهمة مثل فيتامين C والرايبوفلافين والثيامين، وتعدّ البطاطا غنية بالعناصر المعدنية وبخاصة الكالسيوم والبوتاسيوم والفوسفور والمغنيزيوم (The NSF Potato Genome Project). (من الموقع على الشبكة الإلكترونية. (www.potatogenome.org/nsf5/home)

تصاب البطاطا في سورية بعديد من الأمراض الفطرية، ويأتي مرض القشرة السوداء Black scurf الذي يحدثه الفطر *Rhizoctonia solani* في مقدمة تلك الأمراض (خوري وآخرون، 1974)، كونه يحدث خسائر كبيرة كمية ونوعية؛ كما يصيب الفطر عالميا أهم المحاصيل الغذائية التابعة للعائلة الباذنجانية ومنها الباذنجان، والفليفلة، والبطاطا، وكذلك القطن ومحاصيل أخرى (Ceresini *et al.*, 2007)

2. أهداف البحث Objectives:

تنبع أهمية هذا البحث من أن معرفة حدوث مجموعات تشابكية Anastomosis Groups (AGs) نوعية في منطقة ما قد يكون مفيداً لتقويم استعمال مبيدات الفطور الاختيارية لمجموعات تشابكية معينة؛ وفي التنبؤ بتطوّر المرض؛ وتصميم أدوات تشخيص مناسبة؛ وتحديد التعاقب المحصولي في الدورة الزراعية. لذا هدف هذا البحث إلى:

- حصر انتشار مرض القشرة السوداء الذي يحدثه الفطر *R. solani* وتوزيعه في المناطق الرئيسية لزراعة البطاطا في سورية،
- تحديد المجموعات التشابكية AGs للفطر *R. solani* في المناطق المدروسة بطريقة تشابك الهيفا وبالطرائق الجزيئية،
- عزل الكائنات الدقيقة، البكتيرية والفطرية، التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *R. solani* المحدث لمرض القشرة السوداء على البطاطا،
- تأثير المبيد تولكلوفوس ميثيل في مكافحة المرض،
- الإسهام في وضع خطة متكاملة لمكافحة المرض باستخدام الكائنات المضادة (مكافحة أحيائية) والمبيدات الكيميائية للفطور (مكافحة كيميائية).

3. الدراسة المرجعية العامة

يتزايد الاهتمام في سورية بمحصول البطاطا لأهميته في تحقيق الأمن الغذائي. وتركّز الحكومة على استراتيجية الإكتفاء الغذائي، وتحسين إنتاجية المحصول وتنوعه. وفي سورية، هناك ثلاث مناطق رئيسية تناسب زراعة البطاطا هي:

المناطق المرتفعة حول دمشق (700–1400 متر فوق سطح البحر) وتمثل حوالي 30% من الإنتاج الوطني السنوي.

المناطق الداخلية قليلة الارتفاع (200–500 متر عن سطح البحر)، وتتسم بظروف مناخية زراعية متماثلة رغم عدم تجاورها، وتسهم بأكثر من 60 % من الإنتاج الوطني السنوي. وتقع هذه المناطق في محافظات إدلب، حمص، حماة (الغاب)، حلب.

الزراعات البعلية على طول الساحل (قرب اللاذقية وطرطوس)، وتسهم بحوالي 10% من الإنتاج الوطني السنوي.

وفيما يخص الأصناف المزروعة، تقوم الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بإجراء الاختبارات اللازمة على الأصناف المراد استيرادها، وتحدّد الأصناف المسموح بإدخالها. وقد حدّدت في عام 2010 قائمة شملت61 صنفاً، وأوصت بأن يتم الاستيراد من ضمن تلك القائمة وفقاً للمواصفات الفنية. ومن الأصناف الموصى بها: أصناف بينيلا، دراجا، سبونتا، أريندا، مارفونا، أجريا، أورلا، أطلس، آجيبا، آرمادا، ليسيتا، بورين، دايامنت، أرنوفا، مارابيل (دائرة البطاطا في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – اتصال شخصي).

وحسب إحصائيات منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO) لعام 2009 (http://faostat.fao.org)، نجد أن إنتاجية البطاطا في سورية كانت شبه مستقرة في الأعوام الخمسة الأخيرة. وحقق الإنتاج قفزات نوعية وبخاصة في عام 2008، ويعزى ذلك أساساً إلى إقبال المزارعين على التوسّع في المساحات المزروعة بهذا المحصول المهم (جدول 1).

جدول 1: **بعض الإحصائيات عن محصول البطاطا في سورية في الفترة الممتدة من 2005–2009.**

السنة	2005	2006	2007	2008	2009
الإنتاجية/كغ/هـ	20623	21767	18342	19918	19848
الإنتاج/طن	608400	603400	570128	720492	709601
المساحة المزروعة/هـ	29.500	27.270	31.082	36.172	35.751
كمية البذار/طن	34,800	37,298	43,406	42.901	–

وبغية تأمين مواد الإكثار المناسبة ذات النوعية الجيدة، والإقلال من الاعتماد على البذار المستورد، وتوفير القطع الأجنبي، ومنع الاحتكار الخارجي، بدأت المؤسسة العامة لإكثار البذار مشروعاً وطنياً لتأمين حاجة الزرّاع من البذار الجيّد. وهي تتبع في ذلك سياسة متعددة المراحل تبدأ بزراعة النسج، ثم زراعة شتول البطاطا في الدفيئة الزجاجية، ثم في البيوت الشبكية وانتهاءً بالزراعة في الحقول المفتوحة.

تتم الزراعة **ضمن الدفيئة الزجاجية** لإنتاج المراحل المتقدمة من بذار البطاطا – بذار أمهات – وبالنسبة للأمراض النباتية التي تواجه الزراعة في هذه المرحلة فهي قليلة، وذلك بسبب تطبيق برنامج وقائي صارم، فقد تظهر اللفحات (المبكرة والمتأخرة)، وقد ظهرت الإصابة بفطر *R. solani* على كلون من الصنف بينيلا (بسام بياعة، 2007– اتصال شخصي).

تتم الزراعة **ضمن البيوت الشبكية** لمنع وصول الحشرات وبخاصة حشرات المنّ الناقلة للأمراض الفيروسية، وذلك للحصول على بذار سليم خال من الفيروسات وبمرتبة سوبر إيليت (SE).

يلي ذلك الزراعة في **الحقل المكشوف** لتأمين بذار البطاطا والناتج يكون مرتبة إيليت. يزرع ناتج الحقول المكشوفة في الحقل ويصنف الناتج في مرتبة class A.

4. أهم الأمراض الفطرية التي تصيب البطاطا في سورية:

تصاب البطاطا المزروعة في سورية بعديد من الأمراض الفطرية، نذكر فيما يلي أهمها وفق المسح الذي أجراه خوري ورفاقه (1974):

- اللفحة المتأخرة المتسبب عن (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) والتي تعدّ مشكلة رئيسية في المناطق المرتفعة.



- اللفحة المبكرة المتسبب عن (*Alternaria solani* Ellis & G.Martin) وهي من الأمراض الشائعة في كافة المناطق.
- القشرة السوداء المتسبب عن (*Rhizoctonia solani* Kühn)، وبخاصة في العروة الخريفية في محافظة إدلب.

- ذبول فيوزاريوم المتسبب عن (.*Fusarium* spp)، وذبول فيرتيسليوم المتسبب عن (*Verticillium dahlia* Kleb) والذي كان انتشاره كبيراً في (خريف 2007) في عدة هكتارات بمنطقة أعزاز مزروعة بدرنات مجهولة المصدر (بياعة – اتصال شخصي).
- الأنتراكنوز المتسبب عن (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes) والذي عزل مرافقاً للإصابة بذبول فيرتيسليوم من المنطقة آنفة الذكر.

1.4 مرض القشرة السوداء Black Scurf والفطر/الفطور التي تحدثه

سنتناول مرض القشرة السوداء بشيء من التفصيل كونه سيكون المحور الرئيس لدراستنا، وللأضرار الكبيرة التي يلحقها بالإنتاج من الناحيتين الكمية والنوعية.

الطور اللاجنسي للفطر المسبب لمرض القشرة السوداء هو (*Rhizoctonia solani* Kühn). وكان de Candolle عام 1815 م قد أنشأ الجنس *Rhizoctonia* (من اللاتينية "قاتل الجذور") ليضع فيه ممرضاً للجذور، غير متبوغ هو الفطر *Rhizoctonia crocorum*. ومن الصفات الأساسية للجنس التي راعاها ذلك الباحث: تشكيل الفطر لأجسام حجرية (sclerotia) ذات بنية متجانسة، تخرج منها خيوط هيفية، وارتباط الميسيليوم مع جذور النباتات الحية (Parmeter and Whitney, 1970). ويعدّ النوع *Rhizoctonia solani* من أكثر أنواع الجنس *Rhizoctonia* شيوعاً، وقد سُجل على البطاطا من قبل Julius kühn عام 1858م، وتم تسجيله فيما بعد في جميع مناطق زراعة البطاطا في العالم (Tsror, 2010; Ceresini, 1999; Banville *et al.*, 1996; Doornik, 1980). وللفطر *R. solani* عدة مرادفات منها: *Moniliopsis solani* (Moore, 1987) و*Moniliopsis anderholdii* (Wharton *et al.*, 2007; Ceresini, 1999).

يتبع الفطر، في هذا الطور، صف الفطور الناقصة Deuteromycetes، ورتبة الميسيليوم العقيم Mycelia sterilia. وهو يتكاثر في الطبيعة لاجنسياً ويوجد بشكل أساسي على هيئة ميسيليوم خضري و/أو أجسام حجرية. يكون الميسيليوم الخضري للنوع *R. solani* وأنواع الجنس *Rhizoctonia* الأخرى عديم اللون عندما يكون فتياً، ويصبح بني اللون عندما ينمو ويتقدم بالعمر. يتألف الميسيليوم من هيفات مقسمة إلى خلايا فردية بحواجز عرضية (septa مفردها septum)، تحوي هذه الحواجز ثقوباً على شكل كعكة dough-nut، تسمح بحركة السيتوبلاسم والمصورات الحيوية والنوى من خلية لأخرى. تتفرع الهيفا وفق زوايا قائمة، مشكلةً تخنصراً عند نقطة التفرع وحاجزاً عرضياً بالقرب منه، وتمتلك خلاياها أكثر من ثلاث نوى عادةً. وقد استخدم شكل ثقوب الحواجز العرضية septal pore

وعدد النوى في الخلية (cellular nuclear number CNN) على نطاق واسع من قبل الباحثين لتمييز النوع *R. solani* عن الأنواع الأخرى التابعة للجنس ذاته. تتميز خلايا النوع *R. solani* القريبة من القمم النامية للهيفات الفتية بعدد نوى CNN أكثر من 2 (4–11نواة/الخلية) (Berggren, 1985)، ويبلغ عرض الهيفا النامية الرئيسة أكثر من 7mµ، ولون الميسليوم أصفر برتقالي إلى بني قاتم، والأجسام الحجرية، إن وجدت، تكون غير منتظمة الشكل ولونها بني فاتح إلى بني داكن، وغير متمايزة إلى قشرة ولب (Ceresini, 1999).

وهناك تعريف أكثر حداثة وقبولاً (Ogoshi, 1984) يعرّف الفطر بأنه فطر ناقص (ذو ارتباط مع الفطور البازيدية) يتسم بالصفات التالية:

- تفرّع قرب الحاجز الظهري لخلايا الهيفا الخضرية الفتية وتشكيل حاجز في الفرع الهيفي قرب نقطة الأصل،
- تخنصر الفرع الهيفي عند نقطة التفرّع،
- وجود حاجز من نوع dolipore،
- عدم وجود وصلات مقبضية Clamp connection بين خيوط الهيفا،
- الجسم الحجري، عند وجوده، غير متمايز إلى منطقتي القشرة والمخ،
- عدم وجود جدائل هيفية Rhizomorphs،
- عدم وجود أبواغ كونيدية.

وتشير تقارير أخرى إلى إمكانية وضع أنواع الفطر التابع لجنس *Rhizoctonia*، تبعاً لعدد النوى في الخلية الواحدة في ثلاث مجموعات:

1. **ثنائية النوى Binucleate** (نواتان في الخلية الواحدة) وطورها الجنسي يتبع الجنس *Ceratobasidium* Rogers. وتتسم أفراد هذه المجموعة بامتلاكها هيفا أقل ثخانة (4– 7 ميكرونات)، وتشكليلها مستعمرات بلون نشوي إلى بني باهت. ونادراً ما تشكل أجساماً حجرية. ومن الأنواع الممثلة لهذه المجموعة *R. cerealis* van der Hoeren (الطور الجنسي *C. cereale* (Murray & Burpee و *R. fragaria* Hussain & Mc keen.
2. **متعددة النوى Multinucleate** (أكثر من ثلاث نوى في الخليـــة)، مـــع طـــور جنســـي يتبـــع *Thanatephorus* Donk. وتتسم أفراد هذه المجموعة بامتلاكها هيفا عريضة (بقطـــر مـــن 6–14ميكروناً) ، وتكون مستعمراتها ملونة بأصبغة تتراوح من البني الخفيف إلى البني الغامق. تشكّل أنواع هذه المجموعة عادة أجساماً حجرية ذات لون بني. ومـــن أهـــم أنـــواع هـــذه المجموعـــة *Rhizoctonia solani* Kühn (طوره الجنســـي *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk). ومن الأنواع الأخرى التي تنضوي تحـــت هـــذه المجموعـــة مـــع أطـــوار جنســـية نـــذكر *T.*

sterigmaticus ذي التـــوزّع المحـــدود و*T. orchidicola* و*T. corchorus* (Domsch *et a*l., 1980).

3. **متعددة النوى Multinucleate** (أكثر من ثلاث نوى في الخلية) وطور جنســي يتبــع الجــنس *Waitea* (Warcup & Talbot) . وتتسم أفراد هذه المجموعة بتشكيل هيفا ذات أقطار متوســطة (بقطر 5–10 ميكرونات). يتنوع لون المستعمرات والأجسام الحجرية المتشكلة من الأصفر إلـــى القرمزي إلى البرتقالي. تضم هذه المجموعة أنواع *R. oryzae* و*R. zeae*.

لم يقتصر التشويش التصنيفي للفطر *Rhizoctonia* على الطور اللاجنسي فقط، ولكنه امتد ليشمل الطور الجنسي أيضاً. وقد سجل الطور الجنسي للفطر *R. solani* لأول مرة من قبل B. Frank الذي وصف فطراً متبوغاً على نبات الخيار اسماه *Hypochnus cucumeris*. على أن العلاقة ما بين هذا الطور الجنسي و*R. solani* لم تعرف حتى أوضحها Rolfs عام 1904 (Talbot, 1970). وكان Kotilla (1929) الأول الذي حفّز الفطر على تشكيل دعامات (basidia) على وسط الآجار، واصفاً نوعاً جديداً من *Rhizoctonia* منتجاً للأبواغ أسماه *Corticum praticola*. ومنذ ذلك الحين، تم وضع *R. solani* في أجناس *Botryobasidium*، *Pellicularia*، *Ceratobasidium*، وحالياً *Thanatephorus*. ونشر Tu & Kimbrough (1978) مراجعة دقيقة لتصنيف الطور الجنسي للفطور المنضوية تحت الجنس *Rhizoctonia* ووضعاها في عائلة Ceratobasidiaceae. وعرّفا 5 أجناس في العائلة هي: *Ceratobasidium*، *Thanatephorus*، *Waitea*، *Aquathanatephorus*، *Utholobasidium*. وتميّز هذه الأجناس عن بعضها بشكل الدعامة التي تشكلها.

1.1.4 أعراض المرض Disease symptoms:

يصيب الفطر معظم أجزاء نبات البطاطا في الظروف البيئية المناسبة لتطور المرض(Jeger *et al.*, 1996; Grosch *et al.*, 2005). ويحدث الفطر على نباتات البطاطا الأعراض التالية:

تـــأخّر الانبثـــاق، وإضـــعاف النبـــات (Baker, 1970)، تشـــققاً للـــدرنات وتشـــوهاً لشـــكلها (Powelson *et al.*, 1993; Jeger *et al.*, 1996; Grosch *et al.*, 2005)، تقرحـــات علـــى الســـوق تحـــت الأرضـــية والســـوق المـــدادة، وتشَـــكِّل الأجســـام الحجريـــة (القشـــرة الســـوداء) (Hooker, 1981)، انخفـــاض الجـــودة والغلـــة (Jeger *et al.*, 1996; Powelson *et al.*, 1993; Bienkowski *et al.*, 2010; Anderson, 1982) مـــوت مـــا قبـــل الانبثـــاق للبـــراعم، اختـــزال المجموع الجذري، تشكّل الأجسام الحجرية علـــى الـــدرنات الناتجـــة، تخفـــيض القيمـــة التســـويقية، كما تؤثر الإصابة في الحجم المستهدف للدرنات وفي أعدادها.

يهاجم الفطر *R. solani* أجزاء النبات تحت الأرضية أولاً كالدرنات والسويقات الجنينية تحت الفلقية hypocotyls والجذور، وهو أيضاً قادر على مهاجمة الأجزاء العلوية كالبراعم والثمار والأوراق والسوق (Wharton *et al.*, 2007; Ceresini, 1999) القريبة من سطح التربة أو المتوضعة مباشرةً عليها أحياناً، ويحدث المرض بسبب قرب الميسيليوم و/أو الأجسام الحجرية للفطر من أنسجة النبات أو توضعها عليها مباشرة (Ceresini, 1999).

ورغم أن القشرة السوداء هي العَرَض الأوضح للإصابة بالفطر *Rhizoctonia* إلا أن تقرح الساق هو العرض الأكثر إحداثاً للأضرار، حيث يحدث تحت سطح التربة، ويكون عادةً غير ملحوظ. (Wharton *et al.*, 2007)، ويعدّ الذبول المفاجئ damping-off العرض الأكثر شيوعاً لمرض *Rhizoctonia* (Ceresini, 1999). حيث يبدأ الفطر بمهاجمة البراعم بشكل مبكر في بداية موسم النمو قبل انبثاقها من التربة، وقد تموت هذه البراعم نهائياً إذا كانت الإصابة قرب القمة النامية (Wharton *et al.*, 2007).



الشكل 1: **أعراض الذبول التي يسببها الفطر *Rhizoctonia solani***

تظهر الإصابة على البراعم على شكل مناطق محمرة–بنية، وتموت القمة النامية للبراعم المصابة بشدة غالباً. وكلما ماتت البراعم المتشكلة، يشكل النبات براعم أخرى جديدة حتى ينبثق إحداها من التربة (Cubeta *et al.*, 1998). تستنفذ عملية إعادة تشكيل البراعم لتعويض البراعم الميتة مدخرات الدرنة الغذائية الضرورية للنمو المستقبلي. ويؤخر إخفاق إعطاء البراعم الانبثاق ونضج النبات، ويسبب ضعف النبات وتفاوت انتصابه (Cubeta *et al.*, 1998; Wharton *et al.*, 2007). وفي المراحل المبكرة من تطور المرض، يصبح لون مكان الإصابة على المدادات والسوق والجذور بنياً محمراً إلى بني (Wharton *et al.*, 2007)، وكلما تقدمت الإصابة، تصبح مناطق الإصابة محمرة إلى بنية

متقرحة، وتكون هذه التقرحات خشنة بنية وقد تكون غائرة أو متشققة أو كليهما معاً (Cubeta *et al.*, 1998; Wharton *et al*., 2007).



الشكل 2: **أعراض الساق السلكية والتقرحات التي يسببها *R. solani***

سجلت أعراض التفاف الأوراق في حالة الإصابة الشديدة بالفطر *R. solani*، الأمر الذي قد يختلط مع أعراض الإصابة بفيروس التفاف أوراق البطاطا (Wharton *et al.*, 2007). وقد لا تكون النباتات ضعيفة الانتصاب بالضرورة مصابة بالفطر *Rhizoctonia*، فهذا العرض ينتج أيضاً من تحلل الدرنات عندما تصاب بالفطر *Fusarium* أو بالتعفن البكتيري الطري. ولتمييز الممرض في هذه الحالة، يجب سحب النباتات من التربة وفحصها. فالفطر *Rhizoctonia* لا يسبب تحللاً للدرنة، بل يحدث ضرراً للبراعم والمدادات فقط (Wharton *et al*., 2007). وقد يسبب مرض الساق الأسود البكتيري المتسبب عن *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* أعراضاً مشابهةً أيضاً، من حيث ضعف انتصاب النباتات وتقزُّمِها، حيث تبدأ الإصابة من الدرنات وتمتد إلى السوق التي تصبح مسودةً وطريةً وأحياناً متعفنةً بشكلٍ قليلٍ، على خلاف الإصابة بالفطر *Rhizoctonia* التي تسبب تقرحات غائرة على الساق عادةً، ولكن تبقى هذه الساق جافةً دائماً، ويمكن أن تصاب المدادات والجذور به أيضاً (Wharton *et al*., 2007).



الشكل 3: التباين بين الأعراض التي يسببها الفطر *R. solani* (اليمين)، وأعراض الساق الأسود الذي تسببه البكتيريا *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (اليسار).

2.1.4 دورة حياة الفطر ووبائيته Life Cycle and Epidemiology:

تبدأ الإصابة بالأمراض التي يسببها الفطر *Rhizoctonia* على البطاطا من اللقاح المحمول على الدرنة أو من التربة الملوثة. حيث يشتي الممرض على سطح الدرنات وبقايا النبات أو في الترب الملوثة على شكل أجسام حجرية أو ميسيليوم (Cubeta & Vilgalys, 2000; Bharadwaj *et al.*, 2007). وعند زراعة الدرنات الملوثة في الربيع، ينمو الفطر من سطح الدرنة ليصل إلى البراعم، ويصيب الجذر الأساسي، والمدادات الأساسية، ويمكن أن يصيب الورقة الأولى أيضاً. تكون الدرنة الحاملة للقاح مهمة نوعاً ما في إحداث المرض بسبب قربها من البراعم والمدادات المتشكلة (Wharton *et al.*, 2007). تُهاجم الجذور والمدادات في أي وقت خلال موسم النمو، رغم أن احتمالية حدوث معظم حالات الإصابة تكون في الطور المبكر لنمو النبات، وتزداد مقاومة النبات لإصابة المدادات بالمرض بعد الانبثاق فوق سطح التربة، محددةً بذلك زيادة الأضرار في النهاية (Wharton *et al.*, 2007).

ينمو الميسيليوم وتتطور الأجسام الحجرية للفطر على البقايا النباتية على نحو مماثل لنموها وتطورها على الدرنات، وتسمح ببقاء اللقاح في التربة كما على الدرنات من موسم لآخر (Dijst, 1988). وقد أشارت أبحاث سابقة إلى أن درجة حرارة التربة هي العامل الحاسم في بدء حدوث هذا المرض على البطاطا. وترتبط شدة المرض مع درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر بشكل إيجابي، والمجال الأمثل لنمو *R. solani* AG3 هو 5−25 ْس (Wharton *et al.*, 2007). لذا فإن النبات يكون سريع التأثر بالعدوى عندما تكون درجة حرارة التربة ضمن المجال السابق. وتناسب أيضاً درجات الحرارة الباردة والتربة الخصبة وعالية الرطوبة والمتعادلة إلى الحامضية (pH= 7 أو أقل) تطور المرض على البطاطا. تزداد شدة الضرر عند درجات الحرارة الباردة بسبب انخفاض نسب الانبثاق وبطء نمو السوق والمدادات قياساً بنمو الفطر. كما أن نمو البطاطا في الترب الرطبة أبطأ منه في الترب الجافة. وهكذا تتفاقم خطورة الضرر لأن الترب ذات الرطوبة العالية تثبط تطور النبات وتُحَفّزْ نمو الفطر. كما أشارت بعض الدراسات إلى أن درجات الحرارة المرتفعة للترب وبخاصةٍ خلال المراحل المبكرة من نمو النبات تخفض من تأثير الفطر *R. solani* إلى الحد الأقصى حتى في حال توافر اللقاح بكميات كبيرة (Wharton *et al.*, 2007).

تتشكل الأجسام الحجرية في نهاية الموسم، بعد موت النبات بشكل أساسي (Wharton *et al*., 2007). فكلما اقترب النبات من النضج وبدأ المجموع الخضري بالموت الطبيعي أو نتيجة رشه بالمجففات الكيميائية (chemical desiccants)، يمكن للفطر أن يصيب الدرنات الناتجة ليشكل عليها الأجسام الحجرية. ويشار إلى هذه المرحلة من مرض *Rhizoctonia* بمرحلة القشرة السوداء (Cubeta *et al*., 1998). تتشكل الخلايا الحجرية في نهاية تفرعات الهيفا، وتنمو هذه الخلايا عادةً في عناقيد قرب بعضها البعض لتشكل الأجسام الحجرية، والتي يتفاوت حجمها من 1 مم إلى عدة سنتيمترات (Berggren, 1985). وتكون على شكل كتل قاسية، سطحية، بنية داكنة إلى سوداء على سطح الدرنة، غير منتظمة الشكل، وتتفاوت في الحجم من بقع مرئية صغيرة مسطحة إلى كتل مرتفعة كبيرة. وتكون هذه التراكيب مثبتة بإحكام على سطح قشرة الدرنة ولا تخترق الدرنة أو تحدث ضرراً لها أثناء التخزين (Wharton *et al*., 2007). وتتشكل هذه الأجسام الحجرية على الدرنات في الترب قليلة الصرف (Bharadwaj *et al*, 2007). وتمتلك بعض ممرضات الأرز التي تنتمي للفطر *R. solani* القدرة على إعطاء أجسام حجرية ذات طبقة خارجية ثخينة، تمكّنها من الطفو على الماء والمثابرة (Ceresini, 1999).

تختلف الآليات المستخدمة في تشكل الأجسام الحجرية على الدرنات الناتجة (daughter tubers) عنها في تشكل تلك التي تحدث العدوى على النبات الأم. هذا ولم تفهم آلية البدء في تشكل الأجسام الحجرية بشكل جيد حتى الآن، ومن المحتمل أن تحفز بعض المواد التي يفرزها النبات في نهاية حياته هذه الآليات. والدرنات الناتجة من درنات أم معداة لا تكون بالضرورة معدية بالأجسام الحجرية (Wharton *et al*., 2007)، وتختلف القدرة الإمراضية للدرنات الحاملة للقاح (تقاوي مصابة) خلال نمو النبات عن الدرنات المعداة بالأجسام الحجرية، أي تختلف القدرة الإمراضية للفطر المدروس إذا كان اللقاح محمولاً على الدرنة أو موجوداً في التربة (Zakria *et al*., 2002). تعدّ الأجسام الحجرية مسؤولة عن بقاء الفطر وتكرار دورة حياته عدة سنوات في التربة أو على أنسجة النبات (Cubeta *et al*., 1998; Ceresini, 1999; Wharton *et al*., 2007)

يثابر الفطر *R. solani* كذلك على شكل ميسليوم يغزو المادة العضوية للتربة ويعيش مترمماً، كنتيجة جزئية لنشاطه كممرض للنبات. تنبت الأجسام الحجرية و/أو الميسليوم الموجود في التربة و/أو على أنسجة النبات لتشكل هيفات الفطر التي تهاجم مدىً واسعاً من المحاصيل الغذائية ومحاصيل الألياف (Ceresini, 1999).

3.1.4 الأضرار والخسائر الإقتصادية

يعتبر مرض القشرة السوداء والتقرح التاجي من الأمراض الاقتصادية المهمة على البطاطا في أنحاء مختلفة من العالم (Bains *et al.*, 2002) نظراً للأضرار التي يحدثها على أجزاء النبات المختلفة، فهو من الممرضات المهمة خلال كافة مراحل نمو النبات، والخطر الكامن الذي يهدد مناطق إنتاج البطاطا (Read *et al.*, 1989; Yao *et al.* 2002).

تتفاوت الأضرار التي يسببها المرض ويمكن أن تنحصر الإصابة بالمنطقة البنية السطحية، والتي تكون محدودة التأثير في نمو النبات، إلى أضرار شديدة عنما تكون المناطق المصابة كبيرة وغائرة وميتة. وفي حال وجود تقرحات شديدة وعديدة على الساق، قد يطوق التقرحُ الساقَ، معيقاً الحركة الطبيعية للماء والكربوهيدرات عبر ساق النبات (Wharton *et al.*, 2007).

يمكن أن تؤثر التقرحات سلباً في إنتاجية النبات وكمية الدرنات حديثة التشكل التي ينتجها ونوعيتها (Cubeta *et al.*, 1998; Wharton *et al.*, 2007)، نظراً لإعاقتها لحركة الماء والمواد الغذائية داخل النبات. وفي حالات عديدة يمكن أن تكون النباتات المصابة سليمة المظهر (Cubeta *et al.*, 1998). تعتبر الإصابة المتأخرة النتيجة المباشرة لتقرحات المدادات والسوق، الأمر الذي يؤثر سلباً في حركة نقل النشاء (Wharton *et al.*, 2007). وإذا أصيبت المدادات والسوق تحت الأرضية بشدة، فإن ذلك سيعيق تدفق النشاء من الأوراق إلى الدرنات المتشكلة أو يوقفه، وينجم عن ذلك تشكل درنات خضراء صغيرة على السوق فوق سطح التربة تدعى بالدرنات الهوائية (aerial tubers). ويشير تشكل الدرنات الهوائية إلى أن النبات قد لا يمتلك درنات تحت سطح التربة ذات جودة تسويقية. وقد ينجم عن وقف تدفق الكربوهيدرات، تقزم (stunting) أو تورد (rosetting) النبات (Wharton *et al.*, 2007). يمكن أن تنخفض الغلة بإعطاء درنات متشققة غير منتظمة الشكل ذات قيمة تسويقية منخفضة (Cubeta *et al.*, 1998). وإذا استخدمت هذه الدرنات كبذار، فإن الأجسام الحجرية تثبط تشكيل نباتات البطاطا (Ceresini, 1999)، وقد لا تنبت الدرنات شديدة الإصابة (Wharton *et al.*, 2007)، وقد تكون الدرنات المصابة بشكل كبير والمستخدمة كتقاوي غير قادرة على إعطاء السوق نهائياً، وتعطي عوضاً عن ذلك مدادات مع عدة درنات صغيرة. ويشار إلى هذا العرض بظاهرة انعدام القمة (no top)، والذي قد يختلط مع العرض نفسه المتسبب عن ظاهرة فيزيولوجية هي الدرنات القديمة غير النبوتَة (desprouted) (Wharton *et al.*, 2007).

تؤدي إصابة السوق والمدادات والجذور إلى خسائر كمية تؤثر بدورها في حجم الدرنات وعددها. في حين تحدث خسائر نوعية بشكل أساس من خلال إنتاج درنات مشوهة وتطور الأجسام الحجرية على سطح الدرنة (Woodhall *et al*., 2007).

يسبب الفطر *R. solani* أضراراً اقتصاديةً معنوية في الترب الرطبة والباردة فقط. ففي المناطق الجنوبية من ولاية ميشيغان الأمريكية (الأكثر دفئاً)، يسبب الفطر مرض القشرة السوداء على الدرنات، وتقرح الساق والمدادات على أجزاء النبات تحت الأرضية؛ ويحدث خسائر اقتصاديةً غير مترددة، وذلك عندما يكون الطقس بارداً ورطباً في الأسابيع الأولى بعد الزراعة. في حين أنه يعتبر مشكلةً دائمةً في المناطق الشمالية منها حيث تزرع البطاطا في الترب الباردة والرطبة (Wharton *et al*., 2007). وفي ولاية كارولينا الشمالية، يحدث مرض *Rhizoctonia* على البطاطا سنوياً، ولا يلاحظه المزارعون عادةً لأن أعراضه تتطور على الأجزاء تحت الأرضية للنبات، كما أن تقدير الفاقد في الغلة الناتج عن *Rhizoctonia* لا يكون واضحاً حتى بعد الحصاد. ورغم أن هذا الفقد غير موثق في ولاية كارولينا الشمالية، فإن التقديرات له خارج هذه الولاية كانت 10–15% من الإنتاج (Cubeta *et al*., 1998). وأشارت تقارير أخرى إلى أن هذا المرض يحدث فقداً في الغلة يتراوح ما بين 5–35 % (Hodgosn *et al*.,1974; Banville, 1989; Carling *et al*., 1989; Hide *et al*., 1989; Tsror (Lahkim) *et al*., 1996).

4.1.4 المدى العوائلي للفطر

للفطر *R. solani* مدى عوائلي واسع (Otrysko & Banville, 1992; Carling *et al*., 1989; Banville, 1989). ونظراً لهذا المدى الواسع من التنوع في مظهرية العزلات المختلفة وبيئيتها وإمراضيتها التي تتفق مع التعريف الواسع للفطر *R. solani*، فقد حاول عديد من الباحثين تقسيم الأنواع إلى مجموعات أصغر.

ويبين الجدول (2) بعض المجموعات التشابكية العائدة للفطر والعوائل التي تصيبها.

جدول 2: **يبين بعض المجموعات التشابكية العائدة للفطر *R. solani* والعوائل التي تصيبها.**

المجموعات التشابكية Anastomosis group	الأمراض Diseases	العائل Host
AG 1-IA	لفحة الغمد، تبقع الغمد	الأرز
	، الجسم الحجري مرض لفحة الأوراق	الذرة الصفراء
	لفحة الأوراق الورقة المخططة،	الذرة البيضاء
	لفحة الأوراق	الفول
	لفحة الأوراق	فول الصويا
	لفحة صيفية	البرسيم القرمزي
	لفحة شمالية	بادرات الكافور
	التلطخ البني	نباتات المروج
AG 1-IB	اللفحة الشبكية	الفول
		الأرز
		فول الصويا
		التين
		البقوليات الشجرية
		القرطاس
	التقلن	الملفوف
	تعفن القاعدة	الخس
AG 1-IC	الذبول	الحنطة السمراء Buckwheat
	ذبول وتعفن تاج الجزر	الجزر
	الذبول	فول الصويا
		الكتان
		الصنوبر
AG 2-1	الذبول	الصليبيات
	تعفن البراعم	الفريز
	لفحة الأوراق	توليب
	تعفن الجذور	الفجل الياباني
		البرسيمتحت الأرضي
AG 2-2 IIIB	لفحة الغمد الكاذبة	الأرز
	لفحة الغمد	*Lomandra longifolia* الأسل/السمار الياباني mat rush
		الزنجبيل
		الغلايول
	القشرة السوداء	الأرقطيون المأكول
	التلطخ البني	المرج
	تعفن التاج	الذرة الصفراء
	الذبول	الشوندر السكري
		بادرات الأشجار
		القطيفة
	تعفن الجذور	كونجاك Konjak
		البطاطا الحلوة
AG 2-2 IV	تعفن الجذور ولفحة الأوراق	الشوندر السكري

	التلطخ الكبير	المرج
AG 3	القشرة السوداء وتقرح الساق والمدادات	البطاطا
	target spot	التبغ
	لفحة الأوراق	البندورة
	التبقع البني	الباذنجان
AG 4 (HG I، HGII and HGIII)	تعفن الثمار	البندورة
	تعفن الساق	بازلاء
	الذبول وتقرح الساق	البطاطا
	الذبول وتعفن الجذور	فول الصويا
		بادرات صنوبر شمالي كارولينا
		بصل
		ستيفيا
		بازلاء
		الفاصولياء
		القطن
		الفول السوداني
		بقايا
	تعفن القرون	الخضراء الفاصولياء
AG 5	القشرة السوداء	بطاطا
	التلطخ البني	نباتات المرج
	تعفن الجذور	الفول
		فول الصويا
		فاصولياء adzuki
AG 6	مجموعة غير ممرضة	-
AG 7	غير ممرضة	-
AG 8	البقع العارية	النجيليات
AG 9	ممرض ضعيف	الصليبيات
		البطاطا
AG 10	غير ممرضة	-
AG 11		القمح
AG BI	غير ممرضة	-

(Sneh *et al.*, 1991).

ورغم ذكر AG11 على أنها ممرضة على القمح، إلا أن (Eken & Demirci, 2004) وصفوا هذه المجموعة على أنها غير ممرضة، بالإضافة للمجموعة AG12 التي اعتبرها Carling وآخرون من الفطور الجذرية mycorrizal (Carling *et al.*, 1999)، والمجموعة AG13 التي اعتبرت من الممرضات الضعيفة على القطن وتسبب ضرراً بسيطاً على الشعير والقرنبيط والخس والبطاطا والفجل وذلك تحت ظروف المختبر والدفيئة الزجاجية (Carling *et al.*, 2002a). وأثبتت دراسة حديثة حساسية البرسيم الحجازي (Lucerne, *Medicago* sp.) للمجموعة AG6 (Anderson *et al.*, 2004). وهناك دراسات عدة أثبتت أن المجموعة AG-7 مجموعة ممرضة. وفي المملكة العربية السعودية، وجد أن جميع العزلات التي جمعت من حقول البطاطا، انتمت إلى المجموعات AG3، بالإضافة لـــ

(Abd- Elsalam *et al*., 2009) AG7 ،AG5 ،AG4. كما سجلت إصابة البطاطا بالمجموعة AG7 في مناطق مختلفة (Truter & Wehner, 2004; Zakria *et al*., 2002). تعتبر المجموعة AG-10غير ممرضة لعديد من العوائل، وقد تكون مجموعة ممرضة ضعيفة على الصليبيات (MacNish *et al*., 1995). أما مجموعة التجسير، فلم تحدد قدرتها الإمراضية بعد بشكل جيد (& Carling (Sumner, 1992; Sneh *et al*., 1991). كما سجلت مجموعات تشابكية أخرى لهذا النوع كممرضات لعوائل نباتية أخرى مثل المجموعة AG4 على االقمح، والتي تعتبر إحدى المسببات الرئيسة لمرض تعفن الجذور الشائع على القمح Wheat Common Root Rot (Savelyeva & Maystrenko, 1983; (Jalalulddin and Anwar, 1989; Fouly *et al*., 1996) ، كما سجل كل من النوعين *R. solani* (AG-8) و*R. oryzae* كمسببين مهمين لمرض تعفن الجذور الشائع على القمح في الولايات المتحدة الأمريكية (Ogoshi *et al*., 1990) واللذين يترافقان مع الزراعة المبكرة للقمح (Mathieson and (Rush, 1991; Smiley and Uddin, 1993). وأكد الخليفة (2006) أهمية أنواع الفطر *Rhizoctonia* spp. في إحداث مرض تعفن الجذور الشائع على القمح في سورية مع عدة فطور أخرى. وهناك حالة استثنائية تتشكل فيها بعض الأنواع فطوراً جذرية تعايشية mycorrhiza مع أنواع من الــعائلة السحلبية Orchids تتبع عادة للجنس *Ceratobasidium* (Gonzáles García *et al*., 2006).

5.1.4 آلية حدوث المرض

يهاجم الفطر *R. solani* النباتات وحيدات وثنائيات الفلقة. أما على البطاطا، فهو يسبب تقرح الساق والبراعم (sprouts) ومرض القشرة السوداء على الدرنات (Berggen, 1985; Ogoshi, 1987; Carling *et al*., 1989; Zakria *et al*., 2002). يمكن أن تبدأ العدوى من اللقاح الموجود في التربة أو الموجود على الدرنات المصابة (Berggren, 1985; Tsror and Peretz-Alon, 2005)، وتبدأ الإصابة عادةً من الكيوتيكل والبشرة، ويندر حدوثها من خلال الفتحات الطبيعية أو الجروح التي تسببها الديدان.

ورغم أن معظم الأمراض التي يحدثها الفطر *Rhizoctonia* تنشأ من الميسليوم أو الأجسام الحجرية، فإن الإصابة بعديد من أمراض الفول والشوندر السكري والتبغ المهمة تنشأ من الإصابة بالأبواغ البازيدية، والتي تعتبر وسيلةً سريعةً لانتقال الفطر لمسافات طويلة (Ceresini, 1999)، ومصدراً للعدوى الأولية على التبغ (Shew & Melton, 1995; Shew & Lucas, 1991)، ولكن لها دور محدود جداً في وبائية المرض على البطاطا (Carling *et al*., 1989)، وفي مرحلة متأخرة من موسم نمو البطاطا، أثناء فترات من الطقس البارد الرطب (Cubeta *et al*., 1998). تنبت الأبواغ البازيدية لتعطي هيفا تصيب الأوراق (Kucharek, 2000; Ceresini, 1999) حيث يمكن ملاحظة نمو زغبي

أبيض للفطر (يمكن أن يتضمن أبواغاً أو لا يتضمنها) على قواعد سوق البطاطا قرب سطح التربة (Ceresini, 1999)، أو على الوجه السفلي لأوراق البطاطا من الناحية المظللة للنبات (Ceresini, 1999). وتكون هذه الأبواغ غير مهمة عادةً في نشر المرض على البطاطا (Cubeta *et al.*, 1998).

ينجذب الفطر إلى النبات بوساطة المحفزات الكيميائية التي تفرزها خلايا النبات أثناء نموها النشط و/أو أثناء تحلل بقايا النبات. وأثناء الانجذاب، تتصل هيفا الفطر بالنبات ثم تلتصق على سطحه الخارجي. ويستمر الفطر بعد الالتصاق بالنمو على السطح الخارجي للنبات، ويسبب الإصابة فيما بعد بإنتاج بُنْية إصابة خاصة تسمى عضو الالتصاق أو وسادة الاختراق (appresorium or infection cushion)، والتي تخترق خلية النبات وتمتص المواد المغذية، ليستمر الفطر بالنمو والتطور. وتُعَزَّزُ عملية الإصابة بإنتاج عديد من الإنزيمات الخارجية (extracellular enzymes)، والتي تحلل عديداً من مركبات جدر خلايا النبات (مثل السيلليلوز والكيتين والبكتين و...). وكلما قتل الفطر خلايا النبات، استمرت الهيفا في النمو وغزو أنسجة النبات الميتة، مشكلةً أجساماً حجريةً في الغالب. حيث ينتج اللقاح المعدي الجديد على أو في أنسجة العائل. وتتكرر دورة الحياة من جديد عندما يتوافر وسط جديد (Ceresini, 1999).

الفصل الثاني

حصر انتشار مرض القشرة السوداء الذي يحدثه الفطر *R. solani* وتوزيعه في المناطق الرئيسية لزراعة البطاطا في سورية

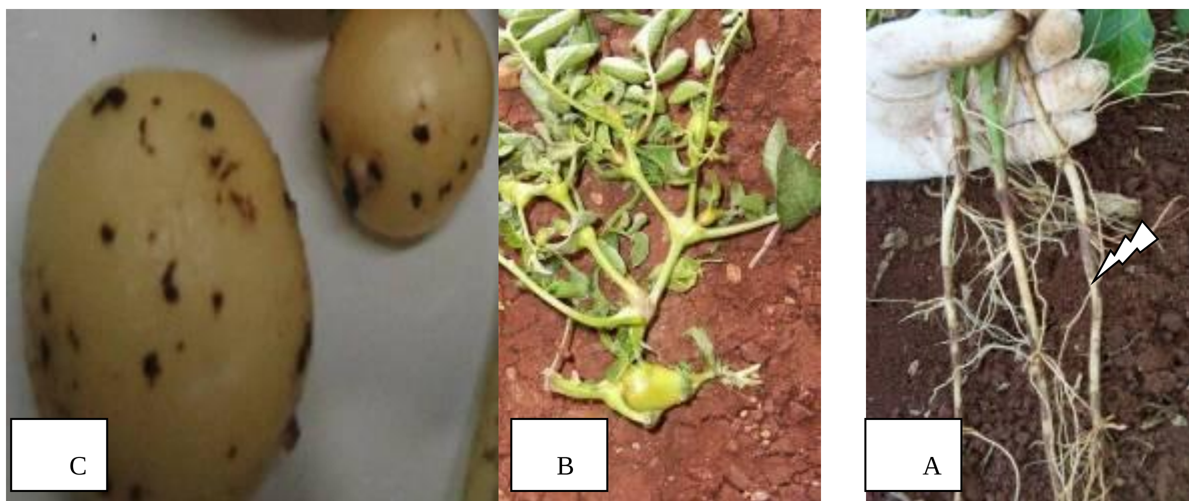
1. مواد البحث وطرائقه: Materials and Methods

1.1 عملية المسح الحقليField Survey

تم تحديد عشوائي لحقول بطاطا مزروعة بحيث مثلت المناطق الرئيسة لزراعة البطاطا في سورية. جمعت عينات نباتية (درنات، مدادات، سوق، جذور) من الحقول الممسوحة؛ كما ُطلب من العاملين في فروع المؤسسة العامة لإكثار البذار في هذه المناطق إرسال عينات بطاطا مصابة بالمرض مع معلومات كافية عن العينات، وتم أيضاً جمع عينات تربة من منطقة جو الجذور (rhizosphere). بدأ الجمع في المراحل الأولى من النمو عند ظهور أعراض تقرّح الساق، وحتى مرحلة تشكل الأجسام الحجرية على الدرنات الناتجة. بلغ عدد الحقول التي جمعت منها العينات، بطريقة عشوائية، 124 حقلاً خلال العروتين الربيعية والخريفية. ففي العروة الخريفية (2007)، شمل المسح الحقلي 11 حقلاً في محافظة إدلب، 19 حقلاً في محافظة حلب، 8 حقول في محافظة حماه، 3 حقول في المنطقة الشمالية الشرقية(الجزيرة)، وحقلين في المنطقة الجنوبية؛ أما في العروة الربيعية (2008)، فشملت عمليات المسح 19 حقلاً في محافظة إدلب، 28 حقلاً في محافظة حلب، 16 حقلاً في محافظة حماه، 12 حقلاً في محافظة حمص، 4 حقول في المنطقة الجنوبية، وحقلين في المنطقة الشمالية. حُفظت العينات في أكياس ورقية ووضعت عليها بطاقة دُونت عليها المعلومات التالية: اسم المزارع أو جامع العينة، المنطقة، الحقل الذي جمعت العينات منه، الصنف المزروع، مساحة الحقل والنسبة المئوية للإصابة، تاريخ الجمع، العروة (ربيعية/خريفية).



الشكل 4: **غياب بعض النباتات في الحقل وتفاوت في الإنبات ناجم عن الإصابة بالفطر *Rhizoctonia* spp. وأخذ العينات الترابية.**



الشكل 5: **الأعراض المختلفة التي يسببها الفطر .*Rhizoctonia* spp A: التقرح على التاج والمدادات والجذر؛ B: تشكيل الدرنات الهوائية فوق سطح التربة؛ C: الأجسام الحجرية على الدرنات.**

2.1 عزل الممرض Pathogen isolation:

غُسلت الأجزاء النباتية (الجذور و/أو الساق و/أو المدادات و/أو الدرنات) تحت الماء الجاري (ماء الصنبور) لفترة كافية. ثم طُهّرت الأجزاء المصابة سطحياً بهيبو كلوريت الصوديوم (NaOCl) تركيزه 0.525 % لمدة 5 دقائق، ثم غسلت بماء مقطر معقم. وضعت قطع ممثلة من الأجزاء المصابة على وسط بطاطا ديكستروز آجار PDA مدعّم بكبريتات الستريبتومايسين streptomycin sulfate بتركيز 120 مغ $ل^{-1}$ كما استخدمت توليفة (Ampicillin 250 مغ +Cloxacillin 250 مغ) بمعدل قرص لكل 500 مل PDA لاجتناب نمو الكائنات الجرثومية غير المرغوبة، وُحضنت الأطباق عند 22–24°س لمدة2–4 أيام.



الشكل 6: **عزل الفطر المسبب للإصابة من أجزاء النبات المختلفة.**

تم تنقية مستعمرات الفطر *Rhizoctonia* بطريقة طرف الهيفا (Hyphal Tip) تبعاً لـــ (Flentje & Sakesena, 1957)، وذلك بتنمية كل عزلة على طبق يحوي وسط PDA وتحضينها عند 25°س لمدة 24–48 ساعة، ثم أخذت قطعة ميسليوم صغيرة من قمة خيط هيفي مفرد من طرف المستعمرة، ونقلت قطع الهيفا إلى أطباق جديدة، وحضنت ضمن الظروف السابقة ذاتها حتى اكتمال نمو الميسليوم على الأطباق.

ولزيادة تماثل العزلات بغرض استخدامها في الاختبارات اللاحقة، لقحت أطباق جديدة بالعزلات النقية وحضنت عند 25 ْس لمدة 24 ساعة، ثم قُطع الميسليوم النامي على كل طبق إلى شرائط طولية وعرضية صغيرة باستخدام مشرط معقم، وأضيف لكل طبق حوالي 1 مل ماء مقطر معقم، وكشط الميسليوم المقطع باستخدام شريحة زجاجية معقمة. نُقل حوالي 1 مل من المعلق الميسليومي بوساطة ماصة دقيقة إلى أنبوب يحوي 9 مل ماء مقطر معقم وأغلق الأنبوب وجونست محتوياته برجه على جهاز Vortex. جرى تخفيف لتركيز المعلق السابق عدة مرات بنقل 1 مل من المعلق بعد التخفيف وإضافتها إلى أنبوب جديد يحوي 9 مل ماء مقطر معقم، حتى الحصول على التخفيفات 10^{-1} و10^{-2} و10^{-3}. ونقل 200 ميكرولتر من كل تخفيف إلى طبق جديد ونشرت على كامل سطح الطبق، وكررت هذه العملية مرتين لكل تخفيف. حضنت أطباق التخفيف عند 25 ْس لمدة 24–48 ساعة، ثم فحصت الأطباق تحت المجهر الضوئي باستخدام التكبير 400x حيث حددت قطع ميسليوم مفردة نامية على سطح الوسط المغذي، ونقلت هذه القطع إلى أطباق جديدة تحوي وسط PDA، حضنت الأطباق كما ذكر سابقاً، وحفظت العزلات النقية بعد اكتمال نمو الميسليوم على الأطباق عند 4 ْس لحين استخدامها.



الشكل 7: **طريقة طرف الهيفا للحصول على عزلات نقية من الفطر *Rhizoctonia* spp.**

3.1 حفظ عزلات الفطر *Rhizoctonia* spp.:

نميت العزلات النقية ضمن أنابيب اختبار تحوى وسط PDA بطريقة الآجار المائل، وحضنت عند 25 ْس لمدة 24–48 ساعة، وأضيف لكل أنبوب زيت البارافين بعد اكتمال نمو الميسليوم، بحيث وصل الزيت إلى ارتفاع 1 سم فوق الحافة العلوية للآجار المائل. ثم حفظت الأنابيب في جو المختبر. كذلك تم حفظ الأطباق الحاوية على عزلات نقية عند 4 ْس وذلك لحين استخدامها.

4.1 اختبار القدرة الإمراضية للعزلات المجموعة مخبرياً Pathogenicity test:

اختبرت القدرة الإمراضية للعزلات التي تم جمعها خلال المسح الحقلي، وذلك بإعداء بادرات بعمر شهرين من الصنف بينيلا (صنف قابل للإصابة بـــ *Rhizoctonia* spp.)، منمّاة في أنابيب اختبار على وسط Murashige & Skoog (MS) (1962)، بمعدل قرصين بقطر 5 مم لكل أنبوب (20 سم × 20 مم) أُخذا من مستعمرات عزلات المسح الحقلي بعمر7 أيام، وُسدت فوهة الأنابيب بقطعة قطن معقم، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة فطرية، وحضنت الأنابيب عند 22±2 ْس و16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام. وتم تطوير السلم السباعي التالي لقياس الشدة المرضية:

0. لا توجد إصابة.
1. تقرح الساق + تحلل الجذر.
2. تقرح التاج + تحلل الجذر.
3. نكرزة خفيفة على الساق + تقرّح التاج + تحلّل الجذر.
4. تقرحات بسيطة على الساق + تقرّح التاج + تحلّل الجذر.
5. تقرحات واضحة على الساق + تقرّح التاج + تحلّل الجذر.
6. تقرّح التاج + تحلّل الجذر+ ذبول النبات.



الشكل 8: **تباين الأعراض التي أحدثتها عزلات المسح الحقلي**

وبعد التأكد من أن المسبب هو الفطر المدروس، حسب متوسط سرعة النمو للعزلات المجموعة أثناء المسح الحقلي، حيث وضع قرص بقطر 5 مم من كل عزلة وسط طبق بتري PDA وبمعدل ثلاثة مكررات. حسب متوسط سرعة النمو لكل مكرر للحصول على متوسط سرعة النمو لكل عزلة، حيث حسبت سرعة النمو لليوم الأول بطرح 5 مم (قطر القرص) من قطر المستعمرة في اليوم الأول، وحسبت سرعة النمو لليوم الثاني بطرح قطر المستعمرة في اليوم الأول من قطر المستعمرة في اليوم الثاني، وحسبت سرعة النمو لباقي الأيام بالطريقة ذاتها حتى اكتمال نمو المستعمرة على كامل الطبق. أيضاً أخذ لون وجهي المستعمرة العلوي والسفلي لكل عزلة على حدا.

2. النتائج

1.2 المسح الحقلي

أظهرت نتائج المسح الحقلي انتشار مرض القشرة السوداء والتقرّح التاجي، في معظم مناطق زراعة البطاطا، حيث بلغ المتوسط العام لنسبة الإصابة بالمرض خلال العروة الخريفية 60.46%، وكانت أعلى نسبة للإصابة في محافظة إدلب (63.63%)، تلتها محافظة حلب (63.15%)، ثم محافظة حماه (62.5%). ولم نتمكن من تحديد نسبة الإصابة في المنطقة الجنوبية لقلة عدد العينات؛ كما لم تسجل أية إصابة في محافظة الحسكة (القامشلي). كانت نسبة الإصابة في العروة الربيعية أعلى منها في الخريفية بمتوسط نسبة إصابة 64.19%، وكانت أعلى نسبة للإصابة في هذه العروة في محافظة حلب (82.14%)، في حين كانت 68.42% في محافظة إدلب، و62.5% في محافظة حماه، وكانت أقل نسبة إصابة في محافظة حمص (16.66%)، ولم تسجل أي إصابة في محافظة الحسكة، ولم تحدد نسبة الإصابة في المنطقة الجنوبية لقلة عدد العينات.

وجد أن حقول محافظة إدلب كانت من أكثر الحقول التي تردّد فيها مرض القشرة السوداء خلال العروة الخريفية، واتخذ المرض المنحى ذاته في حقول محافظة حلب خلال العروة الربيعية، بينما حافظت محافظة حماه على نسبة الإصابة ذاتها خلال العروتين، وكانت أدنى نسبة إصابة في محافظة حمص التي يزرع فيها صنف سبونتا فقط.

أظهرت نتائج المسح، من خلال الاستمارة، أن الأصناف المزروعة في المحافظات التي تم جمع العينات من حقولها كانت: بينيلا، مارفونا، بورين، سبونتا، دراجا، أجريا، فابيولا، ليزيتا وأرنوفا. وتبين أن الصنف بينيلا كان من أكثر الأصناف المزروعة قابليةً للإصابة بمرض القشرة السوداء والتقرح التاجي مقارنةً مع غيره من الأصناف سابقة الذكر. والجدير ذكره أنه كان من السهل تحديد

نسبة الإصابة على مستوى المحصول، أما على مستوى الصنف فقد تعذر الحصول على النسبة الدقيقة، نظراً لاختلاف الأصناف المزروعة من عروة لأخرى، حيث يمكن زراعة كافة الأصناف في العروة الخريفية باستثناء الصنفين دراجا وبورين كونهما يتطلبان فترة سكون أطول من الأصناف الأخرى. وكان الشائع زراعته في هذه العروة الأصناف: بينيلا، مارفونا، سبونتا، أجريا. كما اختلف انتشار زراعة صنف معين باختلاف الصنف المفضل في المنطقة وتوافر البذار للمزارع. ففي مناطق حلب وبعض مناطق إدلب، كان الصنف بينيلا مفضلاً من الزارّع على غيره من الأصناف الأخرى؛ أما في شمال حلب (منطقة أعزاز)، وخلال السنتين الأخيرتين، فقد انتشرت زراعة الصنف الجديد فابيولا بالإضافة للصنف بينيلا؛ أما الأصناف المفضلة في مناطق إدلب فكانت بينيلا، دراجا، مارفونا؛ في حين كان الصنف سبونتا هو الصنف السائد في مناطق حمص؛ أما في المنطقة الجنوبية (إزرع) فكان الصنف السائد هو دراجا.

بين تحليل استمارة المسح الحقلي أن إصابة الحقل بالممرض المدروس تعود لأسباب عديدة منها: زراعة درنات ملوثة بمرض القشرة السوداء، زراعة صنف قابل للإصابة، طبيعة التربة، فالترب الثقيلة الغدقة قليلة الصرف زادت من إصابة النبات بالمرض، وكذلك عدم اتباع دورة زراعية. ففي محافظة حلب، كانت منطقة أعزاز-شمال حلب من أكثر المناطق التي أبدت حقولها نسب إصابة مرتفعة بالمرض نتيجة زراعة البطاطا بشكل متكرر؛ في حين كانت نسبة الإصابة تكاد تكون معدومة في عفرين كون البطاطا لم تزرع في هذه المنطقة سابقاً. أما في محافظة إدلب، فوجد المرض في مناطق الإنتاج الدائم للبطاطا مثل معارة، زردنا، بنش، كفر حلب. أما في محافظة حماه، فكانت كفرنبوده ومناطق الغاب مناطق الإصابة الرئيسة. كما لوحظ أيضاً، خلال عملية المسح الحقلي، أن الحقول المصابة باللفحة (المبكرة أو المتأخرة) كانت عرضة للإصابة بممرضات أخرى ومنها *R. solani*. وتبين أن زراعة درنات أم مصابة لا تؤدي بالضرورة إلى إصابة الدرنات الناتجة بمرض القشرة السوداء، وكذلك فإن زراعة درنات أم سليمة لا تؤدي بالضرورة إلى إنتاج درنات سليمة. ويبين الجدول(3) نتائج المسح الحقلي. (يرجى العودة إلى ملحق الجدول 3 في نهاية الرسالة)

جدول3: متوسط نسبة الإصابة (%) والأعراض التي سببتها الفطور المعزولة على أصناف البطاطا خلال عملية المسح الحقلي لموسمي 2007/ 2008 في محافظة حلب

المحافظة	المنطقة	الصنف	الأعراض	نسبة الإصابة
حلب / خريفي	اكسيبيه	سبونتا	تقزم النبات+ تقرح التاج	لاتتجاوز 1%
	شمال مارع	بينيلا	تحلل التاج + تحلل الجذور	لاتتجاوز 1%
	تركمان بارح	مارفونا	تقرح التاج + تقرح الساق	0%
	وحشية	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة	50%
	السفيرة	أجريا	تقرح التاج + تحلل الجذور	عينة مرسلة
	كفر الورد	بينيلا	ذبول النبات, وتقرح التاج	2%
	تل مالد	بينيلا	تقرح التاج	2%
	الحميدية	مارفونا	الساق المتقرحة	2%
	كفر كلبين	بينيلا	ذبول النبات وتقزمها	1%
	بحورته	بينيلا	تقرح التاج + تحلل للجذور	2%
	صوران	سبونتا	تقرح الساق & المدادات	2%
	صوران	مارفونا	أعراض الذبول وتقزم النبات	1%
	سيجراز	بينيلا	أعراض الذبول	50%
	فريرية	بينيلا	تقرح التاج + تحلل للجذور	80%
	فريرية	بينيلا	تقرح التاج + تحلل للجذور	20%
	مارع	بينيلا	أعراض الذبول وتقزم النبات	2%
	فافين	أجريا	أعراض الذبول	أقل من 1%
	فافين	بينيلا	أعراض الذبول	2%
	تل حسين	بينيلا	درنات مصابة بالقشرة السوداء	أقل من 1%
حلب / ربيعي	تل حدية	بينيلا	تقرح التاج +أجسام حجرية على الدرنات	10%
	تل حدية	بينيلا	أعراض الذبول	10 %
	طرندة	بينيلا	أجسام حجرية على الدرنات	عينة مرسلة
	كفر أنطون	سبونتا	تقرح التاج + تقرح المدادات + درنات مصابة + تحلل الجذور	10%
	كفر جنة	مارفونا	أعراض الذبول	أقل من 1%
	ألجي	سبونتا	أعراض الذبول	أقل من 1%
	ألجي	بينيلا	أعراض الذبول	أقل من 1%
	طعانة	بينيلا	أجسام حجرية على الدرنات	عينة مرسلة
	أحرص	مارفونا	تقرح التاج	2%
	أحرص	بينيلا	لايوجد أعراض	0 %
	فريريه	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة + تحلل الجذور	70%

وحشية	بينيلا	تقرح التاج + تحلل للجذور+ درنات مصابة	%20
عفرين	بينيلا	أجسام حجرية على الدرنات	%1
تل رفعت	فابيولا	تقرح التاج	لا يتجاوز 1%
تل رفعت	بينيلا	تقرح التاج	%2
كوسنيا	دراجا	تقرح التاج + تحلل للجذور	%2
كوسنيا	بينيلا	تقرح التاج	%10
تل خطرة	بينيلا	لايوجد أعراض	% 0
مارع	أجريا	تقرح التاج + تحلل للجذور	% 10
مارع	مارفونا	تقرح التاج + تحلل للجذور	%2
عين جارة	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة	%5
ديوان تحتاني	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة	%5
السموقة	بينيلا	أجسام حجرية على الدرنات	عينة مرسلة
كفركلبين	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة	%2
الساعد	بينيلا	أجسام حجرية على الدرنات	عينة مرسلة
حيلان	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة	%5
كفر ناصح	مارفونا	تقرح التاج	%1
بحورته ربيعي	بينيلا	تقرح التاج + درنات مصابة	%5

تابع جدول3: **متوسط نسبة الإصابة (%) والأعراض التي سببتها الفطور المعزولة على أصناف البطاطا خلال عملية المسح الحقلي لموسمي 2007/ 2008 في محافظة إدلب:**

المحافظة	المنطقة	الصنف	الأعراض	نسبة الإصابة
ادلب/ خريفي	سراقب	مارفونا	تقرح منطقة التاج +تحلل الجذور	%2
	سراقب	بينيلا	تقرح منطقة التاج +تحلل الجذور	%5
	أفس	بينيلا	تقرح منطقة التاج +تحلل الجذور +تقزم النبات	%3
	أفس	سبونتا	أعراض الذبول وتحلل الجذر	%2
	طعوم	بينيلا	تقرح التاج	%2
	شلخ	بينيلا	تقرح الساق	%5
	تفتناز	بينيلا	تحلل التاج والجذر	%2
	تفتناز	بورين	تقرح منطقة التاج +تحلل الجذور	عينة مرسلة
	بنش	بينيلا	تقرح منطقة التاج +تحلل الجذور	%2
	بش مارون	بينيلا	أعراض الذبول وتحلل الجذر	%5
	كتيان	بينيلا	تقرح الساق	%2
إدلب/ ربيعي	كفريا	مارفونا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%10
	كفريا	دراجا	لا يوجد أعراض الممرض المدروس	% 0
	معارة	بينيلا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%100
	جينه	مارفونا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%10
	جينه	دراجا	لا يوجد أعراض الممرض المدروس	% 0
	زردنا	مارفونا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%90
	زردنا	دراجا	لا يوجد أعراض الممرض المدروس	% 0
	كفر حلب	مارفونا	تقرح منطقة التاج+تحلل الجذور+ اجسام حجرية على درنات الدرنات	%10
	كفر حلب	بينيلا	أعراض ذبول وتقزم النبات	%30
	بنش	بينيلا	تقرح الساق+ أعراض ذبول	%10
	بنش	بورين	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%10
	لوف	بينيلا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%100
	أتارب	مارفونا	تقرح منطقة التاج	%10
	تل تونة	بينيلا	تقرح منطقة التاج +تحلل الجذور +أجسام حجرية على الدرنات	%40
	كفر تعنور	مارفونا	تقرح منطقة التاج	%90
	كفر تعنور	بينيلا	تقرح منطقة التاج +أجسام حجرية على الدرنات	%90
	ترمانين	مارفونا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%10
	كتيان	بينيلا	تقرح منطقة التاج	%10
	كتيان	مارفونا	تقرح الساق +اجسام حجرية على الدرنات	%90

تابع جدول 3: **متوسط نسبة الإصابة (%) والأعراض التي سببتها الفطور المعزولة على أصناف البطاطا خلال عملية المسح الحقلي لموسمي 2007/ 2008 في محافظة حماه:**

المحافظة	المنطقة	الصنف	الأعراض	نسبة الإصابة
حماه/ خريفي	الهبيط	مارفونا	أعراض ذبول	%5
	كفرنبودة	بينيلا	أعراض ذبول	%30
	كفرنبودة	أجريا	أعراض ذبول	%8
	كفرنبودة	سبونتا	أعراض ذبول	%10
	قلعة المضيق	سبونتا	أعراض ذبول	%2
	قلعة المضيق	أجريا	أعراض ذبول	%2
	خان شيخون	بينيلا	أعراض ذبول + تقرح التاج	%10
	خان شيخون	سبونتا	أعراض ذبول + تقرح التاج	%10
حماه/ربيعي	السمرة	بينيلا	تقزم & أعراض اللفحة	لفحة متأخرة 70%
	صوران جباريه	فابيولا	أعراض الذبول وتقزم النبات	لم تحدد بدقة بسبب الهطل الشديد2%
	كوكب	بينيلا	أعراض الذبول وتقزم النبات	لم تحدد بدقة بسبب الهطل الشديد
	كفربهم	بينيلا	أعراض الذبول وتقزم النبات	%2
	الخالدية	بينيلا	أعراض الذبول وتقزم النبات	%2
	محردة	مارفونا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	أشير	أجريا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	معرد فتين	بينيلا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	ديمو	أجيبا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	ديمو	بينيلا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	السمرة	بينيلا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	شيزر	أرنوفا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	تل سكندا	سبونتا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	زلاقيات	بورين	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	كفرنبوده	بينيلا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة
	صفصافية	ليزيتا	القشرة السوداء على الدرنة	عينة مرسلة

تابع جدول3: **متوسط نسبة الإصابة (%) والأعراض التي سببتها الفطور المعزولة على أصناف البطاطا خلال عملية المسح الحقلي لموسمي 2007/ 2008 في المنطقة الجنوبية:**

المحافظة	الصنف	الأعراض	نسبة الإصابة
درعا/ خ	بينيلا	تقرح التاج + تحلل الجذور	العينة مرسلة
إزرع/ خ	بينيلا	تقرح التاج + تحلل الجذور	العينة مرسلة
درعا / شقرا	دراجا	أجسام حجرية على الدرنات	العينة مرسلة
درعا / شقرا	دراجا	أجسام حجرية على الدرنات	العينة مرسلة
درعا /المحجة	دراجا	أجسام حجرية على الدرنات	العينة مرسلة
درعا / داعر	دراجا	أجسام حجرية على الدرنات	العينة مرسلة

تابع جدول3: **متوسط نسبة الإصابة (%) والأعراض التي سببتها الفطور المعزولة على أصناف البطاطا خلال عملية المسح الحقلي لموسمي 2007/ 2008 في المنطقة الشمالية:**

المحافظة والمنطقة	الصنف	الأعراض	نسبة الإصابة
قامشلي / خريفي خربة خليل	فابيولا فابيولا	أعراض الذبول	عينة مرسلة
الحسكة / خريفي تل حميس /تل طيب	فابيولا	أعراض الذبول	عينة مرسلة
الحسكة / خريفي حميس/ تل سطيح	فابيولا	أعراض الذبول	عينة مرسلة
الحسكة /ربيعي	بينيلا	أعراض الذبول	عينة مرسلة
الحسكة /ربيعي	بينيلا	أعراض الذبول	عينة مرسلة

2.2 عزل الممرض

تم الحصول على 26 عزلة فطرية من العينات النباتية المختلفة (جذور، مدادات، تاج، سوق، درنات) خلال العروة الخريفية، و54 عزلة خلال العروة الربيعية. ونتيجة العزل والتنقية أمكن تحديد 55 عزلة من .*Rhizoctonia* spp تبعاً للخصائص المورفولوجية لميسيليوم الفطر النامي على وسط PDA.

يبين الجدول (4) تباين العزلات الفطرية المدروسة في سرعة نموها، حيث تراوح متوسط سرعة النمو ما بين 11.27 مم/اليوم للعزلة المتحصل عليها من الصنف مارفونا في منطقة أتارب و24 مم/اليوم للعزلة المتحصل عليها من الصنف ذاته من منطقة مارع، وتلك المتحصل عليها من الصنف بينيلا في سراقب.



الشكل 9: **عزل مكان الإصابة للتأكد من كون .*Rhizoctonia* spp هو المسبب لهذه الأعراض.**

جدول 4: **متوسط سرعة النمو(مم /يوم) لعزلات الفطر** *Rhizoctonia* spp. **المجموعة خلال المسح الحقلي.**

العزلة	رقم المعاملة	متوسة سرعة النمو	العزلة	رقم المعاملة	متوسط سرعة النمو	العزلة	رقم المعاملة	متوسط سرعة النمو
سراقب بنيلا	16	24.00	وحشية ر	47	18.03	جينة	24	15.00
تل مالد	39	21.1	مارع	46	24.00	كتيان	26	15.00
كفر كلبين	38	20.47	كوسنيا سلمى	41	17.87	تل شور	3	14.60
تركمان بارح	28	20.00	كفر نبودة	8	17.53	م فتين	6	14.60
عين جارة	35	19.73	كفر تعنور	23	17.53	بحورتة ر	44	14.60
الساعد	32	19.30	تل حدية	50	16.90	السمرة	1	14.17
آشير	11	18.80	طعانة	31	16.43	شيزر	7	14.17
سراقب مارفونا	17	18.80	كفر ناصح	49	16.43	لوف	13	14.17
ترمانين	19	18.80	منصورة	43	16.37	تل تونة	25	14.17
سراقب بنيلا	16	18.80	ديمو أجيا	10	16.27	محردة	2	13.77
تفتناز	20	18.70	بنش	21	16.27	زردنا	15	13.23
تل رفعت	33	18.70	معارة	27	16.27	بحورتة خ	45	13.03
تل رفعت فابيولا	34	18.63	ديوان تحتاني	30	16.03	صفصافية	4	12.50
طرندة	37	18.53	أحرص	36	15.70	تل سكندا	5	12.50
حيلان	29	18.53	كفريا	14	15.43	أتارب	18	11.27
سموقة	42	18.47	ديمو بنيلا	9	15.00	كتيان	26	15.00
كفر انطون	48	18.37	صوران	12	15.00			
كوسنيا	40	18.30	كفر حلب	22	15.00			

L.S.D $_{1\%}$ = 0.3128، C.V % = 8.8

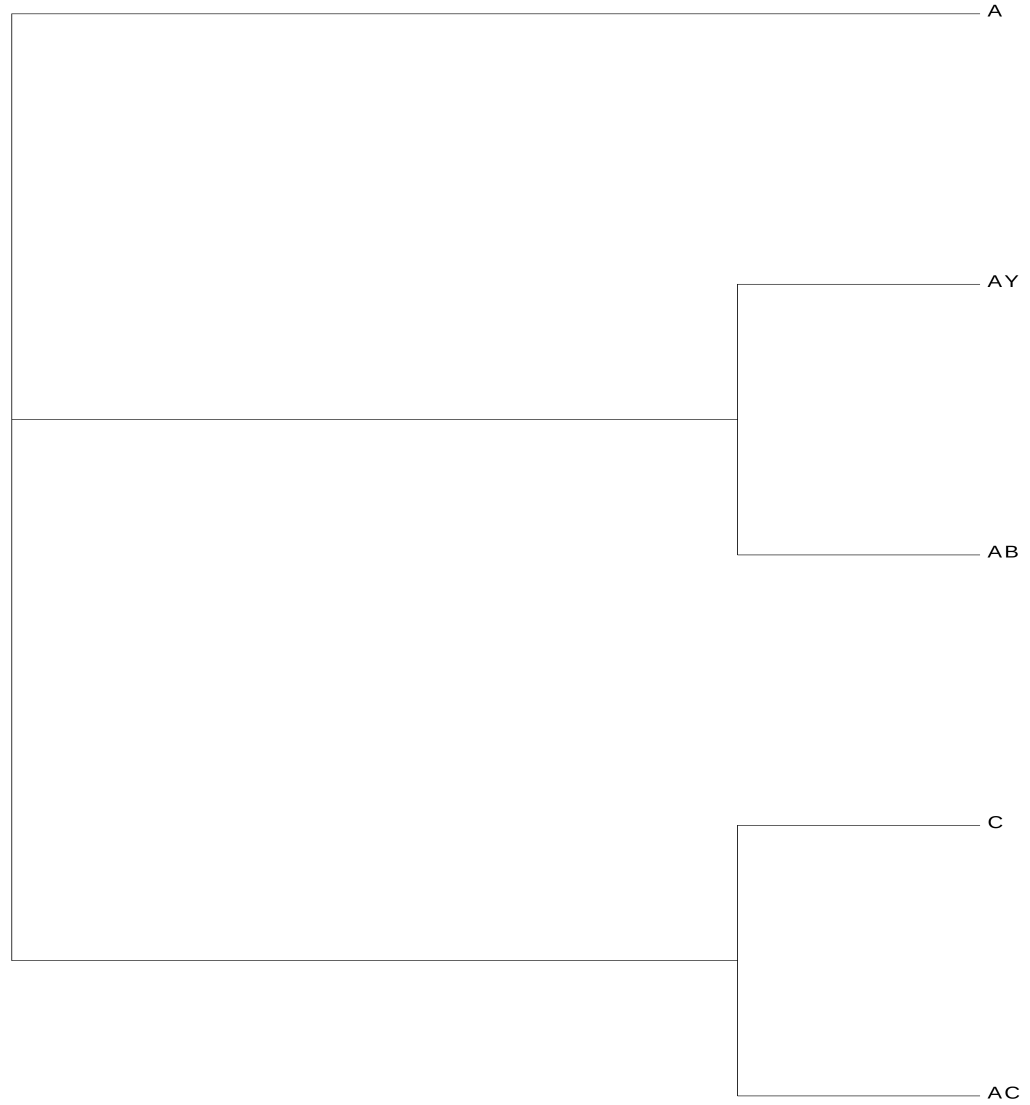
وتباين لون المستعمرة للعزلات وذلك لكلا وجهي الطبق العلوي والسفلي فتراوح من الأبيض إلى الأسود كما هو موضح في الجدول (5).

جدول 5: **لون وجهي الطبق العلوي والسفلي لمستعمرات عزلات الفطر.***Rhizoctonia* spp. **المجموعة خلال عملية المسح الحقلي.**

المحافظة	المنطقة	لون الطبق العلوي	لون الطبق السفلي
إدلب	سراقب	أبيض	أصفر كريمي
	سراقب	أبيض	أصفر كريمي
	تفتناز	أبيض	كريمي
	كفريا	كريمي	كريمي
	معارة	أبيض	ابيض مصفر
	جينه	أبيض كريمي	ابيض مصفر
	زردنا	كريمي	كريمي
	كفر حلب	أبيض	ابيض مصفر
	بنش	كريمي	أصفر كريمي
	لوف	كريمي	كريمي مصفر
	أتارب	كريمي	كريمي مصفر
	تل تونة	كريمي	كريمي
	كفر تعنور	كريمي	كريمي مصفر
	ترمانين	كريمي	كريمي
	كتيان	كريمي	كريمي
حلب	تركمان بارح	كريمي	كريمي
	تل مالد	ابيض	ابيض
	بحورته خريفي	كريمي	كريمي
	تل حدية	كريمي	كريمي مصفر
	طرندة	كريمي	كريمي
	كفر أنطون	كريمي	كريمي
	طعانة	كريمي	كريمي
	أحرص	كريمي	كريمي
	فريريه	كريمي	كريمي
	وحشية	كريمي	كريمي
	تل رفعت ف	ابيض على كريمي	كريمي
	تل رفعت	كريمي	كريمي
	كوسنيا	كريمي	كريمي
	كوسنيا	كريمي	كريمي
	مارع	كريمي	كريمي
	عين جارة	كريمي	كريمي
	ديوان تحتاني	كريمي	كريمي
	السموقة	كريمي	كريمي
	كفركلبين	ابيض ثم تدريجيا الى فضي مسود	أسود مزرق
	الساعد	كريمي	كريمي
	حيلان	كريمي	كريمي
	كفر ناصح	كريمي	كريمي
	بحورته ربيعي	كريمي	كريمي

	تل حسين	أبيض على كريمي	كريمي
حماه	محردة	أبيض	أصفر كريمي
	أشير	ابيض ثم تدريجيا الى فضي مسود	أسود مزرق
	معرد فتين	ابيض ثم تدريجيا الى فضي مسود	أسود مزرق
	ديمو أ	أبيض	كريمي
	ديمو ب	كريمي	أصفر
	السمرة	أبيض	أبيض مصفر
	شيزر	كريمي	كريمي مصفر
	تل سكندا	كريمي	كريمي مصفر
	كفرنبوده	ابيض ثم تدريجيا الى فضي مسود	أسود مزرق
	صوران	أبيض	أبيض مصفر
	صفصافية	كريمي	كريمي مصفر
حمص	تل شور	كريمي	أبيض مصفر

وتبعاً للون الوجه العلوي لمستعمرات العزلات نجد أنها انقسمت لثلاث مجموعات: المجموعة الأولى هي المستعمرات ذات اللون الأبيض؛ المجموعة الثانية هي المستعمرات ذات اللون الأبيض المصفر والأبيض ثم تحولها للأسود؛ والمجموعة الثالثة هي المستعمرات ذات اللون الكريمي والأبيض الكريمي.



الشكل 10: **يوضح مدى التشابه بين العزلات من حيث لون المستعمرة**

A: أبيض

AY: أبيض مصفر

AB:ابيض ثم أسود

C:كريمي

AC: أبيض كريمي

3.2 إختبار القدرة الإمراضية للعزلات المجموعة أثناء المسح الحقلي مخبرياً

أظهرت نتائج اختبار القدرة الإمراضية أن جميع العزلات كانت ذات قدرة إمراضية على الصنف القابل للإصابة بينيلا، أي أن *Rhizoctonia* spp. هو المسبب للأعراض الموصوفة سابقاً. ولكن تباينت الأعراض والشدة المرضية باختلاف العزلات (حسب السلم المقترح)، إذ سببت بعض

العزلات تقرح المنطقة التاجية وتحلل الجذور فقط، في حين سببت عزلات أخرى ذبول النبات، وتحلل المنطقة التاجية، بالإضافة إلى إحداثها تحلل للجذور. كما تباينت العزلات أيضاً في شدة التقرحات التي سببتها على الساق، فبعضها سبب تقرحات واضحة على الساق بطول أكثر من 0.5 سم، في حين سبب بعضها الآخر تقرحات بسيطة لم يتجاوز طولها 0.2 سم، وأحدثت عزلات أخرى نكرزة على شكل بقع صغيرة لم يتجاوز قطرها 0.1 سم وهذا مبين في الجدول (6).

جدول 6: **نتائج اختبار القدرة الإمراضية وتطبيق فرضيات كوخ على عزلات المسح الحقلي (على الصنف بينيلا). التآثر بين العزلات والصنف القابل للإصابة**

المحافظة	المنطقة	التآثر مع الصنف القابل للإصابة (بينيلا)	سلم الإصابة
إدلب	بنش	تقرحات بسيطة على الساق+تحلل الجذور	1
	تفتناز	تقرح التاج + تحلل للجذور	2
	زردنا		
	ترمانين	نكرزة خفيفة على الساق+ تقرح التاج+تحلل الجذور	3
	أتارب		
	سراقب م	تقرحات بسيطة على الساق+ تقرح التاج+تحلل الجذور	4
	سراقب ب		
	لوف		
	كفريا	تقرحات واضحة على الساق+ تقرح التاج+تحلل الجذور	5
	معارة		
	جينه		
	تل تونة		
	كفرحلب	تقرح التاج+ تحلل للجذور+ ذبول النبات	6
	كفرتعنور		
	كتيان		
حلب	تركمان بارح	تقرح التاج + تحلل للجذور	2
	حيلان		
	بحورته خريفي		
	بحورته ربيعي		
	تل رفعت		
	ديوان تحتاني		
	تل مالد		
	طرنده	تقرحات بسيطة على الساق +تقرح التاج + تحلل للجذور	4
	تل رفعت ف		
	كفرانطون	تقرحات واضحة على الساق +تقرح التاج + تحلل للجذور	5
	وحشية		
	كوسنيا		
	كوسنيا(سلمى)		
	مارع		
	عين جارة		
	الساعد		
	كفرناصح		
	تل حدية		6
	طعانة		

	احرص	تقرح التاج + تحلل للجذور+ ذبول النبات	
	فريرية		
	السموقة		
	كفركلبين		
حماه	محردة	تقرح التاج + تحلل للجذور+ ذبول النبات	6
	آشير		
	معردفتين		
	ديمو أجيبا		
	ديمو		
	السمرة		
	شيزر		
	تل سكندا		
	كفرنبودة		
	صفصافية		
حمص	تل شور	تقرح التاج+ تحلل الجذور	2

3. المناقشة

1.3 المسح الحقلي

اختلفت نسبة الإصابة بين المحافظات الممسوحة، وفيما بين العروتين الخريفية والربيعية ووجد المرض في مختلف الظروف البيئية السائدة خلال موسم النمو. وعلى الرغم من أن الفطر يلجأ إلى تشكيل الأجسام الحجرية في نهاية الموسم، إلا أن وجود مرض القشرة السوداء لوحظ خلال المراحل المبكرة أيضاً، ووجد Ritchie ورفاقه (2009) أنه يحدث إنبات الأجسام الحجرية في التربة للمجموعة AG3 ضمن المجال 10–30 ْس، ووجد أن درجة الحرارة المثالية لنمو الميسيليوم في التربة كانت 20–25 ْس، بغض النظر عن المجموعة التشابكية AGs (Ritchie *et al.*, 2009).

لم تلاحظ الإصابة بمرض القشرة السوداء والتقرح التاجي في المنطقة الشمالية الشرقية من سورية (منطقة الجزيرة) ويعزى ذلك لكون هذه المنطقة لم تزرع بمحصول البطاطا سابقاً، ومن هنا تظهر أهمية الطاقة اللقاحية للفطر في التربة وأثر الدورة الزراعية فيها. ففي دراسة في كندا، وجد أن استخدام دورة زراعية متضمنة المحاصيل التالية: الشوندر السكري *Beta vulgaris*، اللفت الزيتي *Brassica compestris*، الشعير *Hordeum vulgare*، البازلاء *Pisum sativum*، القمح *Triticum aestivum*، الذرة الصفراء *Zea mais* أدى إلى عدم إصابة أي من هذه المحاصيل بعزلات الفطر *R. solani* التي تصيب البطاطا، وبالتالي فإن اتباع هذه الدورة من شأنه أن يقلل من الطاقة اللقاحية للممرض في حقول البطاطا (Bains *et al.*, 2002).

2.3 عزل الممرض

أمكن الحصول على الممرض من الأجزاء المختلفة للنبات وهذا يتفق مع Carling وآخرون (1989) الذين وجدوا أعراض الإصابة بالرايزوكتونيا على أجزاء النبات كافة. واختلفت العزلات فيما بينها بسرعة نموالميسيليوم، ولون المستعمرة. وأبدت بعض العزلات رغم تجاورها جغرافياً، اختلافاً من حيث سرعة نمو مستعمراتها ولونها، الأمر الذي يؤكد أن المجموعات التشابكية تعتمد على أنماطها الشرسة (المرضية) وليس على المنشأ الجغرافي سواءً للعائل أو المجموعة التشابكية (Kasem *et al.*, 2010)

3.3 إختبار القدرة الإمراضية للعزلات المجموعة أثناء المسح الحقلي مخبرياً:

اختلفت العزلات فيما بينها من حيث شدة الإصابة، والأعراض التي أحدثتها، رغم تماثل الظروف. ولقد أشارت عدة دراسات إلى الإختلاف الكبير في قدرة عزلات *R. solani* على إصابة البطاطا، حتى ضمن الظروف المثلى، مما يدلل على أن للعوامل الوراثية دور في اختلاف الشراسة (Rubio *et al.* 1996). وسجلت بعض الدراسات تنوعاً حيوياً بين عزلات المجموعة AG3، من حيث الاختلاف في نسبة النمو، وشدة الأعراض وخطورتها (Chand & logan, 1983; Carling & Leiner, 1986,1990a; Anguiz & Martin, 1989; Hill & Anderson, 1989; Balali *et al.*, 1995; Bains & Bisht, 1995; Bandy *et al.*, 1988)، عندما اختبرت العزلات المجموعة على بادرات بطاطا منماة ضمن أنابيب حاوية على وسط موراشيج وسكوغ (MS)، درجة حموضته pH تتراوح من 5.7-5.8.

وفي دراسة Ritchie ورفاقه (2009) وجد أن المجموعتين AG2-1 وAG3 المأخوذتين من البطاطا لهما مجال pH واسع يتراوح من4−8، وذلك على الأوساط المنظمة buffered media، ووجد أن المجموعة AG2-1 تنتج أجساماً حجرية ضمن مجال ضيق منpH5−6، في حين أن AG3 تنتجها ضمن مجال أوسع 4−8. وأثبتت هذه الدراسة أن pH المثلى هي 5.6. وبالتالي فإن الوسط MS هو وسط مثالي لنمو الفطر *R. solani*. وفي دراسة أخرى وجد أن المجال 3.5−7.5 هو المفضل لنمو ميسيليوم *R. solani* على الـــ poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) (Bateman, 1962). كما وجد Grosch ورفاقه (2003) أن pH المثلى لنمو ميسيليوم AG1-1B المعزولة من الخس تراوح من 5−6.

الفصل الثالث

تحديد المجموعات التشابكية AGs للفطر *R. solani* في المناطق المدروسة بطريقة تشابك الهيفا وبالطرائق الجزيئية

1. الدراسة المرجعية

1.1 تقنية تشابك الهيفا

يتضمن الفطر *R. solani* مجتمعاً (مجموعة عزلات، سلالات) متبايناً لا يحدث فيه تزاوج داخلي، يعرف باسم المجموعات التشابكية (Yanar *et al.*, 2005; Anderson, 1982) وقد اقترح Schultz (1936) مخططاً لتقسيم النوع *R. solani* بالارتكاز إلى تشابك الهيفات Anastomosis. إذ وجد أنه عند مواجهة عزلتين من الفطر على وسط الآجار، فإن هيفاتهما تتموان وتتداخلان. وعند حدوث انصهار لهيفات العزلتين، يقال أنهما تتبعان لمجموعة تشابكية واحدة (Ceresini, 1999). وقد اعتمد الباحثون قبل الستينات من القرن الماضي في تصنيف أنواع الجنس *Rhizoctonia* غالباً على الاختلاف المظهري الملاحظ عند زراعة الفطر على الأوساط الغذائية في المختبر و/أو على القدرة الإمراضية على أنواع نباتية مختلفة (Ceresini, 1999).

يستخدم الباحثون العاملون في مجال الفطر *Rhizoctonia* السلالات التفريقية/المُختبرة لكل المجموعات التشابكية لتعريف المجموعات التشابكية التي تنتمي إليها العزلات غير المعرَّفة. ويمكن الحصول على هذه السلالات التفريقية من "المجموعة المزرعية النمطية/النموذجية الأمريكية" (The American Type Culture Collection).

ينتج عن اقتران عزلتين تنتميان لمجموعة تشابكية واحدة اندماج هيفاتهما (Anastomosis)، واختلاط سيتوبلاسم الخلايا في التشابك وهذا يؤدي إما بالقبول (الاندماج التام) أو الرفض (عدم التوافق الجسمي Somatic incompatibility). وتموت الخلايا عادة في نقطة الالتحام (الانصهار) إذا كانت العزلات متباعدة وراثياً (رد فعل قاتل)، وتنصهر بدون أي رد فعل قاتل إذا كانت متماثلة وراثياً. وفي حال كون العزلات من مجموعات تشابكية مختلفة، فإن الإنصهار لا يحدث على الإطلاق. الأمر الذي يوحي بوجود تباين وراثي أكبر بين العزلات، كأن تكون منتمية إلى أنواع مختلفة ...الخ. على أن تفسير نتائج تفاعل التشابك ليس بهذه البساطة دائماً بسبب وجود أربعة أنماط لتفاعل تشابك الهيفات هي: C0 وC1 وC2 وC3، تمثل فيما بينها سلسلة متصلة. ويوجد ضمن المجموعة التشابكية الواحدة نمطان لتفاعل تشابك الهيفات هما C2 وC3 يتناسبان مع دراسة بيولوجية مجتمع الفطر. يمثل النمط

C2 (ويسمى أيضاً التفاعل القاتل) استجابة عدم توافق جسمي بين الأفراد المختلفة وراثياً. والنمط C3 (الاندماج التام) هو صيغة الهوية الوراثية أو التقارب الوراثي بين عزلتين (Berggen, 1985؛ Ceresini, 1999). وكلما تنوّع المدى العوائلي والشراسة للمجموعات التشابكية المختلفة، أصبحت المعلومات عن عزلات هذه المجموعات المتعلقة بمسؤوليتها عن إحداث مرض متخصص مفيدة جداً، لذلك يجب أن تستخدم عزلات *R. solani* AG3 في إعداء النباتات أثناء عملية التربية لمقاومة هذا الفطر (Rauf *et al*., 2007).

وصف Parmeter وآخرون (1969) في الولايات المتحدة الأمريكية أربع مجموعات تشابكية (AG1 حتىAG4). وأكّد Ogoshi (1975) الذي كان يعمل في اليابان المجموعات التي وصفها Parmeter وزملاؤه؛ ولكنه وضع AG2 في تحت مجموعتين AG2-1 وAG2-2 (بالارتكاز على التردّد النسبي لعدد نقاط انصهار الهيفات)، كما أضاف مجموعة جديدة (AG5)؛ ووصف Kuninaga وآخرون (1978) مجموعتين تشابكيتين إضافيتين AG6 و"مجموعة التجسير" AG-B1 (والتي تتحّد أحياناً مع كلٍ من المجموعات AG2-1، AG3، AG6، AG8)؛ كما وصف Homma وآخرون (1983) المجموعة AG7؛ ووصف Neate & Warcup (1985) المجموعة AG8؛ كما وصف Carling وآخرون (1987) المجموعة AG9؛ ووصف Ogoshi وآخرون (1990) المجموعة AG10؛ كما وصف Carling وآخرون (1992) المجموعة AG11؛ ووصف Carling وآخرون (1996) المجموعة AG12. وهناك أيضاً المجموعة AG13 (Carling *et al*., 2002a).

جدول7: **تصنيف تشابك الهيفا لدى الفطر *Rhizoctonia solani* (Carling *et al*., 1990 بتصرف)**

التصنيف	العلاقة	وصف التفاعل
C0	لا يوجد قرابة (مجموعات تشابكية مختلفة)	لا يوجد تفاعل
C1	قرابة بعيدة (مجموعات تشابكية مختلفة أو من المجموعات التشابكية نفسها)	تلامس بين الهيفا؛ اتصال واضح للجدار ولكن لا يوجد دليل على اختراق الجدار أو تلامس الغشاء؛ تموت أحياناً واحدة أو كلتا خليتي التشابك وربما تموت الخلايا المجاورة أيضاً.
C2	متقاربة (المجموعات التشابكية نفسها ولكن من كلونات مختلفة)	اختراق الجدار واضح؛ اتصال الغشاء غير محدد؛ موقع رد الفعل واضح؛ قطر الثقب عند نقطة الاختراق أقل من قطر الهيفا؛ تموت عادةً خلايا التشابك والخلايا المجاورة .
C3	شديدة القرابةً (المجموعات التشابكية نفسها)، (الكلون نفسه)، (العزلة نفسها)	انصهار الجدر؛ انصهار الأغشية؛ نقطة الانصهار غير واضحة؛ قطر الثقب عند نقطة التلامس مساوٍ أو تقريباً مساوٍ لقطر الهيفا؛ قد تموت خلايا التشابك والخلايا المجاورة لها ولكنها لا تموت عادةً.

يعتمد التصنيف على ردود الفعل والتبدلات المصلية التي تحدث في نقطة التشابك بين هيفا العزلتين (رد فعل هيفا–هيفا). وتكون هذه الردود والتبدلات المصلية ملحوظة أو يمكن ملاحظتها على مستوى المجهر الضوئي. ولا يعرف سوى القليل حتى الآن عن الآليات التي تحكم مسيرة هذا التفاعل لدى الجنس *Rhizoctonia* والفطور الخيطية الأخرى. تتحكم في صفة عدم التوافق الجسمي (Somatic

incompatibility) عدة مورثات متعددة الأليلات. وحتى تكون العزلتان متوافقتين يجب أن تكون كل المواقع الوراثية (loci) للتوافقية الجسمية متطابقة (Ceresini, 1999).

تدعم الدراسات المرتكزة على البروتين والـــ DNA حالياً تقسيم فطر *Rhizoctonia* إلى مجموعات متمايزة وراثياً، ولكنها تظهر أيضاً تبايناً وراثياً معتبراً ضمن المجموعة الواحدة. ويستخدم تشابك الهيفا والاختبارات الجزيئية حالياً لمراجعة أدق لكل من تصنيف وبيئية وإمراضية النوع *R. solani* (Ceresini, 1999).

عزلت من البطاطا من مناطق مختلفة من العالم ثماني مجموعات تشابكية هي: AG1، AG2-1، AG2-2، AG3، AG4، AG5، AG8، AG9. ومن بين هذه المجموعات كانت AG3 الأكثر تردداً (Berggren, 1985; Carling & Leiner, 1986; Chand & Logan, 1983; Abe & Tsuboki, 1978; Rauf *et al*., 2007; Wharton *et al*., 2007; Tsror & Peretz Alion, 2005)، أي أن AG3 هي المسوؤلة عالمياً عن حدوث العدوى على البطاطا (Justesen *et al*., 2003; Campion *et al*., 2003; Truter and Wehner, 2004; Lehtonen *et al*., 2008; Cedeño *et al*., 2001)، كما يمكن لمجموعات تشابكية أخرى من الفطر *R. solani* مثل AG2-2 وAG4 أن تكون ممرضة للبطاطا عند درجات حرارة معينة، ولكنها تسبب عادةً أضراراً أقل من المجموعة الثالثة (Wharton *et al*., 2007). كما أن لبعضها مقدرة محدودة غالباً على إصابة أجزاء بعينها من نبات البطاطا، فقد أوضح Carling وآخرون (1998) على سبيل المثال، قدرة المجموعة AG7 على إصابة السوق والمدادات والدرنات ولكن ليس الجذور، في حين لاحظ Hide وFrimager (1990) أن لـــAG8 المقدرة على إصابة الجذور فقط. ووجد أن المجموعة AG4 توجد فقط خلال فترة الإزهار، في حين توجد AG3 خلال مراحل نمو النبات كافة (Carling *et al*., 2000). والمعروف عامة أن AG3-PT هي المسبب الرئيس للمرض في البطاطا، وهي واحدة من تحت مجموعتين لـــ AG3. بينما تترافق المجموعة الأخرى AG3-TB مع التبغ. والمعروف أن تحت هاتين المجموعتين منعزلتين وراثياً (Kuninaga *et al*., 2000)، وتختلفان في المظهر المزرعي، ونمط الحموض الدهنية والمقدرة الإمراضية (Stevens Johnk *et al*., 1993).

2.1 الطرائق الجزيئية باستخدام المؤشرات الجزيئية للـــ DNA:

1.2.1 الدراسة المرجعية

تستخدم المؤشرات الجزيئية بشكل كبير في معظم الدراسات الحالية لأغراض عدة، كرسم الخرائط الوراثية (Kliebenstein *et al*., 2001)، والتصنيف على مستوى الجنس (Flachowsky *et al*., 2001)، وتحديد التنوع الوراثي (Erschadi *et al*., 2000)، وغيرها من الإستخدامات.

وعند مقارنة المؤشرات (الشكلية) المورفولوجية بالمؤشرات الجزيئية، نجد أن الطرائق الجزيئية تعتمد على تباين الـــ DNA، وتكون غنية بالمعلومات، ومستقلة عن الظروف البيئية، وتعتمد على طرائق عدة (Agarwal *et al*., 2008).

ا

استخدمت عدة تقانات معتمدة على الـــ DNA في تحديد المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* (Vilgalys &Cubeta *et al*., 1991; Carling *et al*., 2002b; Gonzalez*et al*., 2001). سمح اكتشاف الـــ PCR من قبل Kary mullis (1983)، (www.nobel-winners.com/Chemistry/**kary**_banks_**mullis**.html) إلى مكاثرة الهدف من كميات صغيرة من الـــ DNA، وهي تقانة تستخدم بشكل واسع في مختبرات التقانة الحيوية، كونها سريعة وغير مكلفة وبسيطة (Erlich, 1989).

1.1.2.1 المبادئ الأساسية لـــ PCR:

1. الحصول على عينات خالية من البروتينات و الشوائب الأخرى.
2. فصل سلسلتي DNA إلى سلاسل مفردة برفع درجة الحرارة إلى 95° س والتي تسمى بدرجة الذوبان/ الإنصهار.
3. اتصال البادئات بالسلاسل المفردة مشكلة نسخة مكملة للسلسلة المقابلة لها عند درجة الإرتباط والتي تتراوح ما بين 55–72° س.
4. تضاعف السلاسل عند درجة الحرارة المثلى 72° س.

وتتكرر العملية خلال دورات PCR

2.1.2.1 دورات PCR:

- **مرحلة التهيئة أو فصل سلسلتي الـــ DNA لكامل المجين *Initialization step* :**

يتم في هذه المرحلة فصل سلسلتي الـــ DNA لكامل المجين وتستغرق مدة 3 إلى 5 دقائق عند 95 سلزيوس (Sharkey *et al*.,1994). يلي ذلك 25 إلى 45 دورة متتالية، يتألف كل منها من ثلاث خطوات هي:

- **خطوة الفصل/ التفسخ *Denaturation step*** :

وهي الدورة النظامية الأولى، وتكون الحرارة ضمن المجال 94–96°س لمدة 20–30 ثانية. وينتج عنها فصل سلاسل الـــ DNA المزدوجة إلى سلاسل مفردة. حيث تسبب الحرارة تحطم الروابط الهيدروجينية بين سلسلتي الحمض النووي الـــ DNA، وبالتالي الحصول على سلاسل مفردة منه.

- **مرحلة الارتباط أو الالتحام *Annealing step*:**

وفيها يتم تخفيض حرارة التفاعل إلى 50–65°س لمدة 20–40 ثانية، مما يسمح بارتباط البادئات بالمناطق المتممة لها على سلسلتي الـــ DNA. وعادةً ما تكون درجة حرارة الارتباط للبادئ أقل بـــ 3 – 5 درجات من درجة حرارة الانفكاك Tm* والتي ترتبط بدورها بطول البادئ من ناحية وبعدد القواعد الأزوتية C+G وT+A. وتسمح بذلك بارتباط البادئات بسلاسل DNA المفردة للبادئات المستخدمة.ويتشكل روابط هيدروجينية عند ارتباط البادئات مع القالب

* Tm هي درجة الحرارة التي يتفكك عندها نصف الـــ DNA مزدوج السلسلة ليصبح أحادي السلسلة.

- **مرحلة الاستطالة /الامتداد *Extension/elongation step*:**

بعد أن يتم ارتباط البادئ بالسلسلة المتممة له، يتخذ أنزيم التكثيف من هذا الإرتباط نقطة بدء له Starting Point لتركيب السلسلة الجديدة. تبدأ هذه الخطوة عملياً منذ اللحظة الأولى لارتباط البادئ بالسلسلة المتممة له، إلا أن درجة الحرارة المثلى لأنزيم التكثيف هي 72°س ، لذلك يتم تسريع عمل الأنزيم من خلال تأمين درجة الحرارة المثلى له. وتعتمد هذه المرحلة على حرارة أنزيم التكثيف Taq polymerase ،وتعد 75–80°س الدرجة المثلى لنشاط الأنزيم وغالباً ماتستخدم 72°س. وفي هذه المرحلة تكمل الـــ DNA السلسلة المكملة لها لتشكل القالب وذلك بإضافة القواعد الآزوتية (Chien *et al*., 1976; Lawyer *et al*., 1993).

3.1.2.1 تقانات تعتمد على PCR

–تقانة التكرارات التسلسلية البسيطة Simple Sequence Repeats (SSRs) او التكرارات المزدوجة القصيرة Short Tandem Repeat (STRs)

تعرف هذه التقانة بـــ Simple Sequence Repeats (SSRs) أو وقد تعرف بـــ Short TandemRepeats (STRs) وتستخدم في تحديد التباين بين الأفراد المتقاربة وراثياً. وهي عبارة عن

قطعة من DNA مكونة من وحدات متكررة يتراوح عددها ما بين 1−5 أزواج من النيوكليوتيدات. وتحاط هذه الوحدات بمقاطع DNA وحيدة. يتم تحديد هذه المقاطع الوحيدة بتصميم بادئات مناسبة مكملة لها لمكاثرة المنطقة المتكررة المحصورة بينها بوساطة تقانة PCR (Morgante and Olivieri, 1993; Smulders *et al*., 1997). وقد استخدمت هذه التقانة من قبل Mwang'Ombe وآخرون (2007) لدراسة التنوع الوراثي ضمن النوع *R. solani* .

ـــ تقانة المكاثرة العشوائية للحمض النووي المتعدد الأشكال Amplified Random Polymorphic DNA (RAPD)

طور William ورفاقه (1990) هذه التقانة للكشف عن التباين الوراثي في المحاصيل النباتية. وتعتمد التقانة على مكاثرة قطع DNA المراد دراسته بوساطة تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR وبوجود بادئة مؤلفة من 10 نيوكليوتيدات. (William *et al*.,1990)، يُؤدي عمل البادئتين بالاتجاه Forward وبعكس الاتجاه Reverse (Spooner *et al*., 2005). ويمكن رؤية نواتج مكاثرة قطع DNA بالترحيل على هلامة من الأغاروز وتلوينها بمحلول بروميد الإيثيديوم، أو على هلامة بولي أكريلاميد باستخدام محلول نترات الفضة (William *et al*.,1990).

ومن محاسن هذه الطريقة: أنها لا تحتاج لمعرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدي للمادة الوراثية المراد دراستها؛ وعدم الحاجة لاستخدام انزيمات التحديد والتي تكون غالباً مكلفة؛ كما لايتطلب استخدامها التعريض للمواد المشعة؛ وهي طريقة غير مكلفة؛ ولايتطلب إنجازها جهداً ووقتاً طويلاً؛ وتستخدم لتوصيف المجموعات ذات الأعداد الكبيرة من الأفراد. ويؤخذ على هذه التقانة: انخفاض موثوقيتها، فهي حساسة جداً للإجراءات المتعلقة بتفاعل الـــ PCR، وهذا يؤثر في مكاثرة الـــ DNA وبالتالي تكون نسبة الخطأ أكبر (Kozol *et al*., 1994؛Robichaux *et al*.,1997)

ـــ تقانة تضخيم القطع المتباينة الناتجة عن التجزيئ الأنزيمي Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).

اكتشفت هذه التقانة لأول مرة من قبل (Zabeau & Vos,1993؛ Vos *et al*., 1995). وتعتمد على مكاثرة انتقائية لبعض قطع DNA الناتجة عن التجزيء بأنزيمات التحديد بالـــ PCR، وتؤمن عدداً كبيراً من تباين العصابات على هلامة البولي أكريلاميد، .وتحدد التباينات الوراثية الجزيئية لـــ AFLP بوجود أو عدم وجود جزيء DNA الناتج عن تجزيء وتضخيم DNA المجين. وتتضمن أربع مراحل: هضم مجين DNA، ربط البادئات، مرحلة التضخيم الأولي والتضخيم الإنتقائي، وتحاليل الهلام (Vos *et al*., 1995)

ومن محاسن *AFLP:* إنتاج مستويات عالية من التباين الوراثي، لاتتطلب معرفة مسبقة لصيغة الـــ DNA، وهي رخيصة نسبياً، وسهلة، وسريعة، وطريقة موثوقة لإنتاجها عدداً كبيراً من المؤشرات الوراثية (Vos *et al*.,1995,1997). ولكن يؤخذ على هذه التقانة صعوبة تحديد المؤشرات، homologous markers (alleles)، ولذا فإنها غير مفيدة للدراسات التي تتطلب دقة في توزع حالات البدائل allelic states (Mueller & Wolfenbarger,1999).

استخدمت هذه التقانة لفهم تركيب مجتمع AG3-PT (على البطاطا) و AG3-BT (على التبغ) (Ceresini *et al*., 2002). كما استخدمت أيضاً لتعريف عزلات *R. solani* من الفاصولياء ومقارنتها مع المجموعات التفريقية لمعرفة المجموعات التشابكية التي تنتمي لها هذه العزلات (Olmos –Lopez *et al*., 2005)

2. مواد العمل وطرائقه

1.2 تحديد فئات المجموعات التشابكية للفطر *R. solani*

1.1.2 تقنية تشابك الهيفا

تم مواجهة العزلات المختلفة المجموعة أو المقدّمة من مناطق مختلفة مع عزلات *R. solani* المفرّقة (Tester isolates)، والتي تم الحصول عليها من جمهورية مصر العربية؛ وذلك بوضع قرص من العزلة، التي يرغب بتحديدها، بعمر4 أيام مع قرص لكل من العزلات المفرقة بقطر 5 مم من كل منهما ناميتين على وسط PDA وعلى بعد 2 سم على وسط الآجار المائي WA في أطباق بتري بقطر 9 سم. حضنت الأطباق عند 25 ْس لمدة 24–48 ساعة (Rauf *et al*., 2007).أخذت قطعة 0.5–1 سم^2 من منطقة اتصال العزلتين ووضعت على شريحة زجاجية، ثم وضعت عليها قطرة من محلول السفرانين القاعدي والمؤلف من المواد التالية:

- 6 مل 0.5% وزن/حجم سفرانين O في الماء المقطر،
- 10 مل 3% وزن/حجم KOH في الماء المقطر،
- 5 مل غليسيرين. (Sneh *et al*., 1991).

وغطيت بساترة زجاجية ثم فحصت تحت المجهر. كما تم استخدام صبغة أزرق الميثلين والجيمسا لفحص تفرعات الهيفا، حيث اعتبر اندماج الهيفا في 3 نقاط أو أكثر في مناطق التشابك دليلاً إيجابياً على أن العزلتين تنتميان للمجموعة التشابكية ذاتها (Parmeter *et al*., 1969) وكرّر هذا الإجراء 3 مرات للعزلات غير المعروفة. تعتبر الطريقة الموصوفة أعلاه طريقة تقليدية لتحديد المجموعات التشابكية للفطر المدروس.

2.1.2 اختبار القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية مخبرياً

أخذت بادرات من الصنف بينيلا (الصنف القابل للإصابة) بعمر شهرين نامية في أنابيب زجاجية (20 سم×20 مم) حاوية على وسط غذائي خاص لتنمية البطاطا (موراشيغ وسكوغ MS). أعديت هذه البادرات بمعدل قرصين بقطر 5 مم أخذت من مستعمرات بعمر 7 أيام من الفطر للمجموعات التشابكية AGs (AG1، AG2-1، AG2-2، AG3، AG3P، AG4HGI، AG4HGII، AG5، AG6، AG8، AG9، AG12) حيث AG3P هي تحت المجموعة AG3 المتخصصة على البطاطا وحضنت في غرفة نمو عند 22±2 ْس و16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام وبمعدل 3 أنابيب/مكررات لكل مجموعة تشابكية بالإضافة الى الشاهد. وبعد مرور شهر وسبعة أيام من الإعداء، عُزل الفطر الممرض من أجزاء نباتية مختلفة للنباتات المعداة. تم أيضاً أخذ قرص بقطر 5 مم من كل من المجموعات التشابكية للفطر الممرض بعمر 7 أيام ووضع في مركز طبق حاوي على وسط PDA، حضنت الأطباق عند 22±2 ْس، لمعرفة سرعة النمو ولون الأجسام الحجرية لهذه المجموعات، وأخذت القراءات بعد 45 يوماً من التحضين.

2.2 الطرائق الجزيئية

1.2.2 تحضير الفطر

تم تنمية عزلات الفطر المعزولة خلال المسح الحقلي والعزلات المفرقة (الشاهد) على وسط PDA وذلك بوضع قرص بقطر 5 مم من كل عزلة (أخذ من حافة مستعمرة بعمر 7 أيام نامية على وسط PDA)، وسط طبق بتري وحضنت الأطباق عند 24±2 °س في الظلام لمدة 7 أيام لاستخدامها في عملية استخلاص الــ DNA. وفق طريقة (Coddington & Gould, 1992) المعدلة وفق التعديلات التالية:

1. عدم تلقيح الوسط السائل Czpaek Dox (oxiod) بأقراص الفطر ووضعها على رجاج متحرك, وإنما زراعتها على وسط PDA.
2. عدم ترشيح الميسيليوم عبر طبقات الشاش وحفظها في الأزوت السائل.

2.2.2 استخلاص DNA (DNA Extraction)

الغاية من هذه العملية هي فصل الحمض النووي عن مكونات الخلية الأخرى كالبروتينات والليبيدات والألدهيدات (Sambrook *et al.*,1989).

كشط سطح الوسط المغذي، بوساطة شريحة نظيفة معقمة، للحصول على ميسيليوم الفطر *Rhizoctonia* spp بالإضافة للعزلات المفرقة حسب الطريقة الموصوفة

(www.fgsc.net/fgn44/weiland.html). وقد تم الاستخلاص بطريقة Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) ووفقاً لـــ (Saghai-Maroof *et al*., 1984) :

- طحن ميسيليوم الفطر في هاون بورسلان، وأضيف لكل منها 1 مل من محلول الاستخلاص CTAB hexadecyl trimethyl ammonium bromide والمسخن إلى درجة حرارة 65°س ثم وضع المزيج في أنابيب معقمة سعتها (2.2 ميللي ليتر)، ووضعت الأنابيب ضمن حمام مائي عند 65°س لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر، من أجل مجانسة مستخلص الفطر مع محلول الاستخلاص.
- وضعت الأنابيب مباشرة في الثلج لمدة 5−10 دقائق. وأضيف لكل منها مقدار 1 مل من كلوروفورم /أيزواميل بنسبة 1:24 وُحرك الأنبوب يدوياً رأساً على عقب لمدة 15 دقيقة عند حرارة المختبر.
- وضعت الأنابيب في مثقلة بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة.
- نقلت الطبقة العلوية والتي تمثل الطور المائي Aqueous phase الحاوية على الأحماض النووية (بمعدل 1 مل) إلى أنابيب أخرى جديدة سعة 2.2 مل.
- أضيف لكل أنبوب 6 ميكروليتر من أنزيم الــ RNase (10 mg/ml)، وضعت الأنابيب في الحاضنة عند 37° س لمدة 30 دقيقة للتخلص من الحمض النووي الريبوزومي RNA والحصول على DNA فقط، ثم وضعت الأنابيب في المجمدة (−20 °س) لمدة 10 دقائق.
- أضيف 1مل من الــ isopropanol بتركيز 100 % محفوظ عند −20° س، وتم مزج المحتويات بهدوء بقلب الأنبوب رأساً على عقب عدة مرات لترسيب الــ DNA.
- ثقلت الأنابيب على سرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 6 دقائق. وتم التخلّص بعد ذلك من الرائق وبقي الراسب (pellet) وهو عبارة عن كتلة الــ DNA.
- غسلت كتلة DNA المترسبة بإضافة 500 ميكرولتر من الإيثانول البارد −20° س بتركيز 75% . وضعت الأنابيب في المثقلة لمدة 5 دقائق على سرعة 12000 دورة /دقيقة لطرح محلول الغسيل وتركت كتلة الــ DNA المترسبة لتجف عند حرارة المختبر.
- بعد إتمام التجفيف، أضيف لكل أنبوب 100 ميكرولتر من مادة TE بتركيز 1X وتركت الأنابيب حتى اليوم التالي عند 4 ° س وذلك حتى تمام ذوبان كتلة الــ DNA.

3.2.2. تقدير كمية ونوعية الــDNA المستخلص من خلال ترحيل العينات ضمن هلامة آغاروز

DNA Qualification and Quantification using Agarose Gel

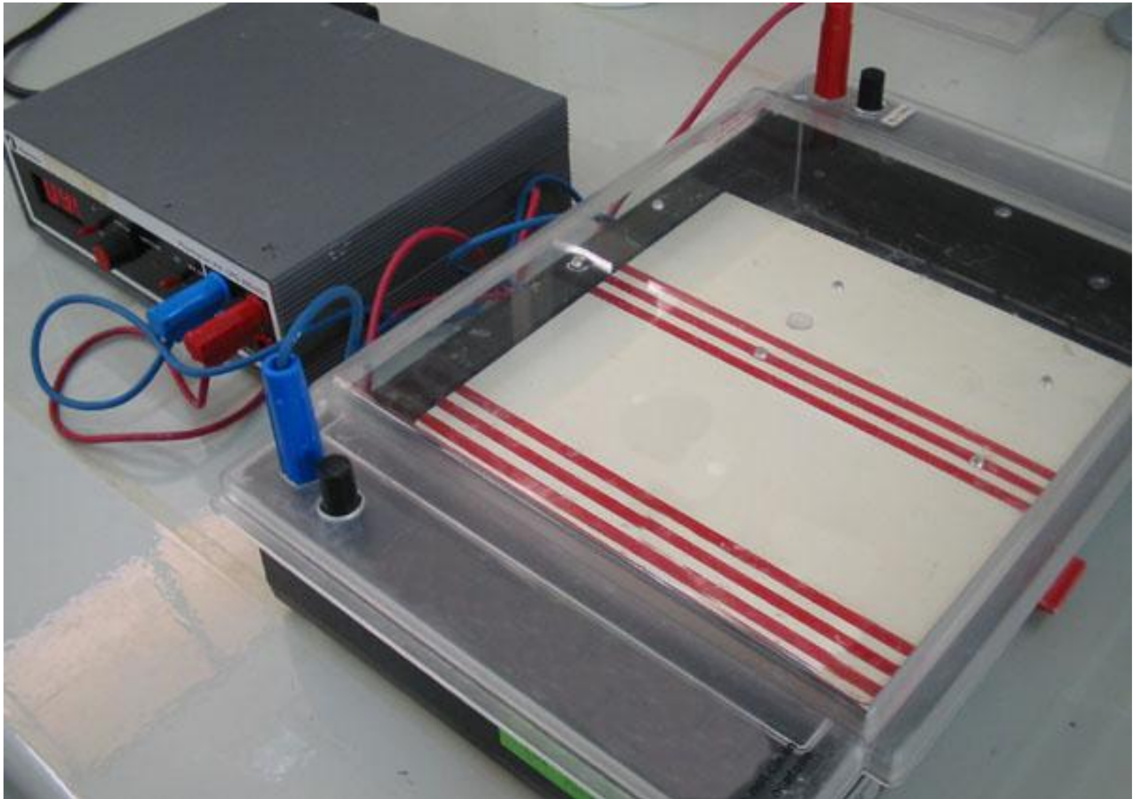
يمكن تقدير جودة الأحماض النووية بوساطة جهاز رحلان أفقي وباستخدام هلامة الأغاروز (عبارة عنD-galactose & 3,6-anhydro L-galactose) بعد إذابته في أحد المحاليل المنظمة مثل 1X TBE buffer، حيث تظهر جزيئات الــ DNA كعصابات أعلى الهلام نتيجة هجرة جزيئات الــ DNA ذات الشحنة السالبة باتجاه القطب الموجب ضمن مجال كهربائي. ولرؤية عصابات الــ DNA، يتم صبغ الهلام بمحلول بروميد الايثيديوم Ethidium Bromide الذي يشكل معقداً مع جزيئات الــ DNA ويومض إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet. هذا وتتناسب شدة الومضان طرداً مع كمية DNA المراد معرفة تركيزها. تظهر العينات ذات الجودة العالية على شكل حزم أو عصابات على الهلامة ذات وزن جزيئي مرتفع، في حين يدل عدم وجود التقطيع إلى جودة عينات الــ DNA. وقدر تركيز DNA بشكل تقريبي من خلال شدة توهج العينات المراد تحليها مع الواسم المعروف الكمية والموضوعة على طرفي الهلامة، (Sambrook *et al.*,1989).

تحضير هلامة الآغاروز:

1. حضرت هلامة الآغاروز1%, بأخذ 1 غ من الأغاروز مضافاً لــ 100 مل من المحلول المُنظم (1X TBE buffer) (Tris-acetate-EDTA buffer) في دورق سعته 250 مل.
2. سخن المزيج إلى درجة الغليان حتى ذوبانه بشكل جيد، وبرد حتى أصبحت حرارته 50°س.
3. أخذت حاوية سعتها 250 مل، وأغلق طرفيها بشريط ورقي لاصق وبشكل مشدود ومستقيم حتى تكون حواف الهلامة مستقيمة، وضعت الأمشاط المناسبة (حسب عدد العينات المراد دراستها) لتشكيل الحفر التي ستحمل العينات وعلى مسافات متساوية قدر الإمكان.
4. سكب المزيج في إحدى زوايا الحاوية وبهدوء وترك حتى يتجمد جيداً ثم أزيل اللاصق وغمر في المحلول المنظم TBE x1 وأزيلت الأمشاط.



الشكل 11: **صفيحة سكب الآغاروز مع المشط**



الشكل 12: **جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي المستخدم**

تحميل عينات الــDNA على هلامة الآغاروز

تم تحميل 2 ميكرولتر من مخزون stock DNA لكل عزلة وأضيف إليها 3 ميكرولترات من سائل التحميل الممدد 10X Agarose Loading Buffer (0.25% Bromophenol blue, 50% Glycerol, 60 mM EDTA. pH=8). وتأتي أهمية محلول سائل التحميل كونه:

1. يمنح الغليسيرول الموجود في سائل التحميل عينات DNA الكثافة اللازمة كي تستقر في الحفرة
2. أما صبغة Bromophenol blue فتُعطي العينات اللون الأزرق الذي يُمكننا من رؤيتها أثناء التحميل، وكذلك تقدير المسافة التي قطعتها جزيئات DNA ضمن هلام الأغاروز.

تم تحميل 5 ميكرولترات في كل حفرة خاصة بعزلة معينة وبحذر، وقد استخدم الواسم DNAλ Lambda ذو وزن جزيئي معروف 50 و 100 نانوغرام (100 نانوغرام/ 10 ميكرولتر) ووضع في الحفرتين الأولى والأخيرة لكل مشط ضمن هلام الأغاروز،.ورفع الفولطاج تدريجياً حتى 90 فولط، حيث كانت جهة الرحلان من القطب السالب إلى القطب الموجب.

تلوين هلامة الآغاروز

غمرت هلامة الآغاروز في سائل التلوين (محلول 1XTAE الذي يحوي على مادة بروم الايثيديوم بتركيز 0.5 ميكروغرام/ مليلتر) لمدة 30 دقيقة مـــع التحريك الهادئ على هزاز آلي. أزيل سائل التلوين، وغسلت الهلامة بالماء لمدة دقيقتين، ثم عرضّت إلى الأشعة فوق البنفسجية UV باستخدام جهاز تصوير هلامة الآغاروز(Image Analyzer (Eagle Eye II Staratagene) ، وتم تصوير هلامة الآغاروز باستخدام كاميرا موجودة ضمن الجهاز سابق الذكر. يربط هذا الجهاز مع حاسوب ويتم نقل الصورة بعد تصويرها بالكاميرا إلى الحاسوب لتخزن على شكل ملف صورة تتم طباعته باستخدام طابعة خاصة.

4.2.2 تضخيم الــ DNA بوساطة التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR) وباستخدام بادئات SSR متخصصة

تم في هذه المرحلة استخدام 4 أزواج من البادئات الخاصة بـــ SSR الفطر.*R .solani*. للكشف عن العزلات التابعة للمجموعة التشابكية AG3، بالإضافة إلى المجموعات الفرعية التابعة لهذه المجموعة التشابكية. استخدمت هذه البادئات لتضخيم الــ DNA بوساطة تفاعل PCR وباستخدام جهاز التدوير الحراري Thermocycler. وحُضّر المزيج الخاص بهذا الاختبار

جدول 8: **المواد المستخدمة في المزيج الخاص وحجم المواد المستخدمة وتركيزها:**

المواد المستخدمة في المزيج الخاص	**الحجم المُستخدم لكل مادة (µl)**
(50 ng/µl) DNA	2
المحلول المنظم 10X OPA buffer	2
النيوكليوتيدات الأربعة dNTPs (2 Mm/µl)	2
البادئة اليمينية / اليسارية **(10 pml)**	1 لكل بادئ
أنزيم التكثيف	0.1
الماء المقطر والمعقم S.D.H2O	11.9
الحجم النهائي	20

وفق البرنامج التالي:

95ْس لمدة 3 دقائق

ثم 35 دورة وفق ما يلي:

95ْس لمدة 15 ثانية

52ْس لمدة 15 ثانية

72ْس لمدة 30 ثانية

وأخيراً 72ْس لمدة 5 دقائق

جدول 9: **التتابع النيكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تفاعل الـــ PCR للكشف عن عزلات المجموعة AG3 للفطر *R. solani*.**

المجموعة	**البادئةاليمنية** **' (Forward primers) 5 '**	**البادئةاليسارية** **(Reverse Primers) 3 '**
AG3 F: :AG3-1F R:ITS4-B	5'-AAT AAG TCA TTG AAC CCT TC-3	5'- CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG-3')
AG3P F: AG3-2F R:AG3PT-1R	(5-'CTG AAC GCC TCT AAG TCA. GAA-3'	5-'CTT GAT TAA TGC AAC TCC C-3'

AG3 TB F: AG3-2F R:AG3TB-1R	5-'CTG AAC GCC TCT AAG TCA GAA-3'	5-'CAA CAA CAA TCT CCA AAT CC-3'
AG3 TM F: AG3-2F R:AG3TM-1R	5-'CTG AAC GCC TCT AAG TCA GAA-3'	5-'TCA TTC TTG ATC CAC TAG TC-3'

حيث AG3: المجموعة التشابكية AG3. حيث AG3-1F (Arakawa, Unpublished)، ITS4-B AG3P: تحت المجموعة AG3 المتخصصة على البطاطا. حيث AG3-2F (Kuninaga *et al.*, 1997), AG3PT-1R (Kuninaga *et al.*, 1997)..

AG3 TB:تحت المجموعة AG3 المتخصصة على التبغ. حيث AG3-2F (Kuninaga *et al.*, 1997), AG3TB-1R (Kuninaga *et al.*, 1997)

AG3 TM: تحت المجموعة AG3 المتخصصة على البندورة. حيث AG3-2F (Kuninaga *et al.*, 1997)، AG3TM-1R (Kuninaga *et al.*, 1997)

جدول 10 : **معلومات عن بادئات SSR الخاصة بالفطر *R. solani*.**

البادئ	الكمية µg	التركيز(الحجم 1 مل) بيكو مول/µl	الحجم لـ 100 بيكومول/µl	الوزن الجزيئي g/mol	درجة حرارة الانفكاك س°Tm
AG3-1F	157	25.9	259	6060	42.6
ITS4-B	238	33.6	336	7074	55.2
AG3-2F	219	34.3	343	6399	49.1
AG3PT-1R	126	21.9	219	5723	44.5
AG3TB-1R	243	40.7	407	5983	46.8
AG3TM-1R	177	29.5	295	6018	40.8

5.2.2 استخدام تقانة مكاثرة القطع المتباينة الناتجة عن التجزيئ الأنزيمي Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

ـ مرحلة هضم/تقطيع الـــDNA Digestion DNA:

تم هضم 300 نانوغرام من DNA في حجم تفاعل نهائي بلغ 20 ميكرولتر باستخدام نوعين من أنزيمات التحديد Restriction Enzymes الأول هو *MseI* (*Tru91*) (موقع التمييز Recognition Site: 5'T TAA3') والثاني *PstI* (موقع التمييز Recognition Site: 5'CTGCA G3') وبوجود مادة (BSA) Bovine Serum Albumin Acetylated وهو بروتين يساعد على ثباتية الأنزيمات خلال عملية هضم الـــ DNA، ويمنع التصاق الأنزيمات بأنابيب التفاعل "htpp://en.wikipedia.org/wiki/Bovine serum albumin" والمحلول المنظم (OPA10x) 10 X One Phor All Buffer

جدول 11: **المواد المستخدمة في مرحلة الهضم وحجم المواد المستخدمة وتركيزها:**

الموادالمستخدمة في عملية الهضم	الحجم المُستخدم لكل مادة (µl)
(20 ng/µl) DNA	15
المحلول المنظم 10X OPA buffer	2
أنزيم التحديد *MseI* (10 U/µl)	0.5
أنزيم التحديد *PstI* (10 U/µl)	0.5
(10µg/µl) BSA	1
الماء المقطر والمعقم S.D.H2O	1
الحجم النهائي	20

حضنت الأنابيب عند 37 ْس في جهاز PCR لمدة 4 ساعات. تعمل خلالها أنزيمات التحديد على تقطيع سلسلتي DNA عند مواقع التحديد مشكلةً ما يُسمى بالنهايات اللزجة Sticky Ends. تعتبر عملية الهضم الكامل عاملاً مهماً للحصول على نتائج صحيحة ودقيقة (لتجنب مكاثرة قطع DNA غير مجزأة (Uncut Fragments)؛ ويُسهم في ذلك استخدام DNA عالي النقاوة والنوعية واستخدام كمية وافرة من أنزيمات التحديد.

ـــ مرحلة الإلتحامLigation of adapters:

أخذت 10 ميكروليترات من DNA المهضوم، في حجم تفاعل نهائي بلغ 12.5 ميكرولتر وأضيفت إليها أشرطة الإلتحام المكوّنة من *Tru* 91 adapter + *Pst*I adapter المتوافقة مع أنزيمات التحديد المُستخدمة؛ إضافة إلى المحلول المنظم (OPA10x) وأنزيم الربط T4 DNA Ligase وrATP كمصدر للطاقة لإكمال التفاعل، بالإضافة للماء المقطر المعقم. وحضنت في جهاز التدوير الحراري عند 37^{o} س وتركت حتى اليوم التالي. أخذ ناتج التفاعل ومددت كل عينة بمعدل 3 أضعاف، وذلك بإضافة الماء المقطر المعقم. يقوم خلالها أنزيم الربط T4 DNA Ligase بربط أشرطة الإلتحام بقطع الـــ DNA المجزأة. ونحصل في نهاية عملية الربط على قطع DNA ذات نهايات معروفة التسلسل النيوكليوتيدي من الطرفين.

جدول12: **المواد المستخدمة في مرحلة الربط وحجم المواد المستخدمة وتركيزها.**

المواد المستخدمة في مرحلة الربط	الحجم المُستخدم لكل مادة (µl)
DNA المهضوم*	10
المحلول المنظم 10X OPA Buffer	0.25
أدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP (10mM)	0.25
وصلات *PstI* (5 *p*mol/µl)	0.25
وصلات *MseI* (50 *p*mol/µl)	0.25
أنزيم الربط (3 U/µl)	0.2
الماء المقطر والمعقم S.D.H2O	1.3
الحجم النهائي	12.5

اختبر نجاح عملية الهضم من خلال تمرير منتجات الهضم على هلامة الأغاروز 1% للتأكد من عملية الهضم واللصق لكل العينات. حيث أخذ 5µl من عينات كل مرحلة وأضيف إليها 2µl من منظم التحميل loading buffer في جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي. وبعد انتهاء عملية التحميل والترحيل ، تم معاملة الهلامة بعدها بــــ Eithidiume bromide وتركت على الهزاز وبحركة بطيئة لمدة 15–20 د، ثم غُسلت بالماء المقطر، وعرضت للـــ UV.

مرحلة التضخيم الأولي Pre-amplification Reaction:

مدد ناتج التفاعل ligated DNA, حيث مددت كل عينة بمعدل 3 أضعاف، وذلك بإضافة الماء المقطر المعقم. أخذت 4 ميكرولترات من الناتج الممدد في المرحلة السابقة والتي ستستخدم كقالب في حجم تفاعل نهائي بلغ 20 ميكرولتر، يحتوي على 10X PCR Buffer وبوجود أنزيم التكثيف *Taq* DNA Polymerase والقواعد الآزوتية الأربعة dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) والبادئتين M00 و P00 و E00.

جدول13: **المواد المستخدمة في مرحلةالتضخيم الأولي وحجم المواد المستخدمة وتركيزها.**

المواد المستخدمة في مرحلة التضخيم الأولي	الحجم المُستخدم لكل مادة (µl)
Ligated DNA الممدد	4
المحلول المنظم 10X PCR Buffer	2
النيوكليوتيدات الأربعة dNTPs (0.2mM/µl لكل واحد)	2
البادئة الأولى *PstI/EcoRI* primer (50 ng/µl)	1
البادئة الثانية *MseI* primer (50 ng/µl)	1
أنزيم التكثيف *Taq* DNA polymerase (5 U/µl)	0.2
الماء المقطر والمعقم S.D.H2O	9.8
الحجم النهائي	20

ثم أجري تفاعل PCR (30 دورة) بعد تغطيتها بشكل جيد في جهاز التدوير الحراري وفق البرنامج التالي:

- 94° س ←30 ثانية لفصل سلسلتي DNA (Denaturation).
- 56° س ←30 ثانية لارتباط البادئات (Annealing).
- 72° س ←1 دقيقة° وهي الحرارة المثالية لنشاط أنزيم التكثيف كي يقوم بتركيب السلسلة الجديدة (Extension).

اختبر ناتج التفاعل لهذه المرحلة على هلامة أغاروز 1% للتأكد من حدوث التضخيم كما ذكر في المراحل السابقة.

مرحلة التضخيم الإنتقائي Selective AFLP amplification

يتم في هذه المرحلة اختيار عدد من قطع DNA التي تُمثل مواقع وراثية مُوزعة بشكل عشوائي على كامل المجين تُشكل نموذج البصمة الوراثية للعينة المدروسة. مدد ناتج تفاعل PCR المرحلة السابقة 3 أضعاف أيضاً بإضافة الماء المعقم المقطر، وأخذ 2µl من كل عينة بعد تمديدها، وأجري التفاعل في حجم نهائي 10 ميكرولترات، يحتوي على 10X PCR Buffer وبوجود أنزيم التكثيف *Taq* DNA Polymerase والقواعد الآزوتية dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

تم اختبار 15 توليفة (Combinations) مؤلفة كل واحدة من بادئة خاصة بالأنزيم *MseI* وأخرى خاصة بالأنزيم *PstI* أو *EcoRI* مع أربعة عينات فقط في البداية بهدف اختبار التوليفات التي قد تعطي أكبر نسبة من التباينات مع العزلات المدروسة حيث كان تركيز كل بادئ 50 نانوغرام/ميكرولتر في التفاعل الواحد.

جدول 14: **المواد المستخدمة في مرحلة التضخيم الانتقائي وحجم المواد المستخدمة وتركيزها.**

المواد المستخدمة في مرحلة التضخيم الأختياري	الحجم المُستخدم لكل مادة (µl)
منتجات PCR الممدة	2
المحلول المنظم 10X PCR Buffer	1
النيوكليوتيدات الأربعة dNTPs (0.2mM/µl لكل واحد)	1
بادئات P/E (50 ng/µl)	1
بادئات M (50 ng/µl)	1
أنزيم التكثيف *Taq* DNA polymerase (5 U/µl)	0.1
الماء المقطر والمعقم S.D.H2O	4.9
الحجم النهائي	10

جدول15: **التتابع النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في مرحلة التضخيم الإنتقائي.**

البادئ	التتابع النكليوتيدي
M00	5'GAT GAG TCC TGA GTA A :
M43	5'GAT GAG TCC TGA GTA A ATA
M47	5'GAT GAG TCC TGA GTA A CAA
M50	5'GAT GAG TCC TGA GTA A CAT
M60	5'GAT GAG TCC TGA GTA A CTC
M95	5'GAT GAG TCC TGA GTA A AAAA
P00	5' GAC TGC GTA CAT GCA G
P12	5' GAC TGC GTA CAT GCA G AC
P38	5' GAC TGC GTA CAT GCA G ACT
P100	5' GAC TGC GTA CAT GCA G AACC
P101	5' GAC TGC GTA CAT GCA G AACG
P107	5' GAC TGC GTA CAT GCA G AATA
P114	5' GAC TGC GTA CAT GCA G ACAT
E00	5' GAC TGC GTA CCA ATT C
E01	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A
E14	5' GAC TGC GTA CCA ATT C AT
E32	5' GAC TGC GTA CCA ATT C AAC
E36	5' GAC TGC GTA CCA ATT C ACC

أجري تفاعل PCR من خلال سلسلتين من الدورات الحرارية تكوّنت الأولى من 12 دورة، إذ رفعت درجة الحرارة في كل دورة إلى 94°س لمدة 30 ثانية ثم خفضت إلى 65°س لمدة 30 ثانية (تنخفض الحرارة 0.7° س في كل دورة)؛ ثم 72° س لمدة 60 ثانية. أما الثانية فتضمنت 27 دورة حيث وصلت درجة الحرارة في كل دورة إلى 94° س لمدة 30 ثانية ثم 56°س لمدة 30 ثانية وأخيراً 72°س لمدة 60 ثانية. تم بعدها فحص نتائج المضاعفة الناتجة عن الـ PCR من خلال ترحيل منتجات التفاعل ضمن هلامة البولي أكريلاميد وباستخدام جهاز رحلان كهربائي عمودي.

6.2.2 **.تحضير هلامة البولي أكريلاميد Polyacrylamid Gel:**

حُضرت هلامة بولي أكريلاميد 6% حسب (Promega Co, 1994) باستخدام لوحي زجاج أحدهما بطول 43 سم والثاني 41 سم وبعرض مشترك 33 سم ووفقاً للخطوات التالية:

- تم مسح الزجاجتين الصغيرة والكبيرة بالماء المقطر ثم بالكحول الإيثيلي95% بوساطة محارم ورقية.
- وضع 3 مل من مادة Bind silne (Methacryoxypropyltrimethoxy Silane) على الزجاجة الصغيرة، ووزع على كامل الزجاجة، وترك لمدة 15 دقيقة. يقوم هذا المحلول بخفض التوتر السطحي والتصاق الهلام باللوح الزجاجي الصغير. ثم مسحت ثلاث مرات بالكحول الإيثيلي 95% لإزالة الكمية الزائدة من المادة المذكورة.
- وضع 400 ميكرولترمن مادة Repel silne (Dimethyldichlorosilane solution) ووزعت بلطف على كامل الزجاجة الكبيرة وتركت لمدة 15 دقيقة. تمنع هذه المادة التصاق الهلامة بالزجاجة الكبيرة. مسحت بعدها مرة واحدة بالماء المقطر.
- وضع شريطين نظيفين spacer من النوع نفسه وبسماكة 0.4 مم على طرفي اللوح الكبير، طبق اللوح الصغيرعلى اللوح الكبير، بحيث يكون وجه الهلامة للداخل، وثبت اللوحان بوساطة 4 مشابك معدنية clips.
- حضر 1 لتر من محلول مكون من57 غ أكريلاميد + 3غ Bis acrylamide +420 غ يوريا +60 مل من مادة 10X TBE وخلطت تلك المواد جيداً. أخذ 75 مل من محلول بولي أكريلاميد 6 % ضمن كأس زجاجي وأضيف له 50 ميكرولتر من محلول TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylenediamine ثم أضيف 350 ميكرولتر من مادة بيروسلفات الأمونيوم APS10x (ammonium persulfate) التي تساعد على البلمرة ومزجت المكونات جيداً. وضع اللوحان الزجاجيان بشكل مائل، وتم صب الهلام بينهما وأعيدا إلى الوضع الأفقي. وضع مشط بلاستيكي من الأعلى، وترك لمدة ساعة ونصف حتى تبلمر الهلام بشكل جيد.

7.2.2 فصل جزيئات DNA المكاثرة على هلام الأكريلاميد بوساطة جهاز الرحلان الكهربائي وتم تبعاً ذلك لــ (Promega Co, 1994)

1. ثبتت هلامة بولي أكريلاميد على جهاز الرحلان الكهربائي الشاقولي، وأضيف لتر واحد من المحلول المنظم 0.5X TBE إلى الحوضين العلوي والسفلي لجهاز الرحلان.
2. تم توصيل مزود الطاقة الكهربائية بجهاز الرحلان الكهربائي لتسخين الهلامة قبل تحميل العينات ضمن المجال 50–60°س.
3. أخذ ناتج PCR للمرحلة الأخيرة بمعدل 10 ميكرولترات وأضيف له 10 ميكرولترات من منظم التحميل buffer loading الخاص ببولي أكريلاميد (STR 3X loading solution)
4. قبل عملية التحميل، فصلت السلاسل الثنائية لقطع الــDNA المضخمة من خلال تعريضها لدرجة حرارة 95 س لمدة خمسة دقائق ونقلها مباشرة إلى الثلج حتى تحميل العينات.
5. حقن العينات ضمن الحفر التي أحدثتها أسنان المشط في الهلامة حيث تم تحميل 5 ميكروليترات من كل عينة.
6. وضع شاهد (Marker) وهو قطعة من DNA معروفة الوزن الجزيئي PGEM (100bp – 1000).

8.2.2 تلوين DNAعلى هلامة البولي أكريلاميد بوساطة نترات الفضة DNA Silver Staining System:

تمت عملية تظهير/تلوين (Staining) هلامة البولي أكريلاميد باستخدام نترات الفضة تبعاً لــ (Manual, Promega Co, 1994)، حيث استخدمت ثلاثة محاليل لهذه العملية:وهي كالتالي:

1. محلول التثبيت Fix/stop Solution (حمض الخل 10% Acetic Acid)
2. محلول التلوين Staining Solution (2 غرام من نترات الفضة Silver Nitrate).
3. محلول التظهير Developer Solution (60 غرام من كربونات الصوديوم +400 ميكرولتر ثيو سلفات الصوديوم1% +3 مل فورم ألدهيد37%.)

- غمرت الهلامة بعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي في حاوية بلاستيكية ضمن محلول التثبيت مع التحريك على هزاز آلي مدة 20 دقيقة.
- غُسلت الهلامة بعدها ثلاث مرات (دقيقتان لكل مرة) باستخدام ليترين من الماء المقطر.
- أُضيف إلى محلول الصبغ 3 مل من محلول الفورم ألدهيد 37%.Formaldehyde ثم غُمرت الهلامة فيه لمدة 30 دقيقة مع التحريك.

- غسلت الهلامة بعد التلوين بالماء المقطر المعقم البارد مدة 10 ثوان مع التحريك بهدف إزالة نترات الفضة الزائدة.
- أُضيف إلى محلول التظهير المُبرد 3 مل من الفورم ألدهيد 37% +400 ميكرولتر من محلول ثيوسلفات الصوديوم 1% Sodium Thiosulfate ثم فُرغ في حاوية بلاستيكية، وغمرت الهلامة في نصف كمية محلول التظهير مع التحريك.
- وفور ظهور عصابات DNA، تم التخلص من المحلول وأضيفت الكمية الباقية منها، ثم استخدم محلول حمض الخل مرة ثانية لإيقاف عملية التظهير.
- أزيلت الهلامة من محلول التظهير وغسلت بالماء المقطر مدة دقيقتين.
- تركت الهلامة حتى اليوم التالي لتجف تم تسجيل القراءات يدوياً.
- أخذت صور الهلامات بوساطة الماسح الضوئيscanner وخزنت بالحاسوب.

9.2.2 جمع البيانات والتحليل الاحصائي:

تم تسجيل البيانات من خلال تسجيل العصابات الظاهرة على هلامات البولي أكريلاميد بطريقة بيانات العد الثنائي Binary Data (1 لوجود العصابة – 0 غياب العصابة). استُخدم برنامج NTSYS-PC Version 2.1 (Rohlf, 2000) لحساب قيمة معامل التشابه الوراثي Genetic similarity Index (GS) بين كل زوج من العينات وذلك حسب معامل Jaccard Coefficient (Jaccard, 1908) وفقاً للمعادلة التالية:

$$\{GS = a / (a + b + c)\}$$

حيث a تمثل التلاقي الموجب (1:1) – b التلاقي (1:0) – c التلاقي (1:0).

أخذت المواقع الوراثية Loci الواضحة تماماً والممتدة طولاً بين 150 إلى 500 نيوكليوتيد مع تجاهل الاختلافات في كثافة الحزم وذلك ضمن مسارات العينات في هلامة البولي أكريلاميد ومن ثم جرى حساب عدد مؤشرات التعددية الشكلية Polymorphic Markers لكل توليفة على حده ورسمت الشجرة الوراثية حسب معامل Hamming Coefficient (Hamming, 1950)

3. النتائج

1.3 تحديد فئات المجموعات التشابكية لعزلات الفطر Identification of AGs of *Rhizoctonia* spp المجموعة أثناء المسح الحقلي في سورية

1.1.3 تقنية تشابك الهيفا

تشير النتائج المعروضة في الجدول (16) إلى أن معظم العزلات انتمت للمجموعة التشابكية AG3 المسبب الرئيس لمرض القشرة السوداء وتقرح الساق على البطاطا في مناطق أخرى من العالم. وعزلت من أجزاء النبات المختلفة. وانتمت عزلة واحدة فقط وهي عزلة صوران (67) للمجموعة AG1، والتي تم عزلها من جذور البطاطا، ولم نتمكن من تحديد انتماء عزلتي سراقب مارفونا (46) وسراقب بينيلا (52)، اللتين أحدثتا تشابكاً جزئياً مع المجموعتين AG3 وAG8 والعزلة تل مالد (36) التي أحدثت تشابكاً جزئياً مع كل من المجموعتين AG2 وAG3 وكانت شبيهة بعزلتي سراقب مورفولوجياً. وشكلت عزلتا سراقب وعزلة تل مالد أجساماً حجرية بنية برتقالية، وكانت قد عزلت من منطقة التاج، ولم تحدث مرض القشرة السوداء على الدرنات. كما لم تحدث عزلات كفرنبوده (62) وآشير (59) ومعردفتين (58) وكفركلبين (25) أيضاً تشابكاً مع المجموعات التفريقية المتوافرة، ولكن بعد ثلاثة أيام من وضع القرص على وسط PDA، بدأ ظهور اللون الأسود ابتداءً من مركز الطبق، ثم تحول كامل الطبق للون الأسود. إلا أنها لم تشكل أجساماً حجرية ظاهرة كغيرها من العزلات الأخرى على وسط PDA، علماً أن هذه العزلات الأربع عزلت من الأجسام الحجرية الموجودة على درنات البطاطا المصابة. وكان لون ميسيليوم العزلات السابقة أبيض فضي وبعد ثلاثة أيام ظهر اللون الأسود من المركز وشمل كامل الطبق. وعليه، يمكن القول اعتماداً على طريقة تقابل الهيفات، انتماء47 عزلة (85.45 %) للمجموعة التشابكية AG3، وأحدثت هذه العزلات نمطي التشابك C2 وC3، في حين انتمت عزلة واحدة فقط وهي عزلة صوران (1.82 %) للمجموعة AG-1 وأحدثت نمط التشابك C3، ولم نتمكن من تحديد المجموعات التشابكية لسبع عزلات (12.73%).

جدول 16: تعريف العزلات السورية الممرضة والمجموعات التشابكية التي انتمت إليها اعتماداً على تقنية تشابك الهيفا:

اسم العزلة	رقم العزلة	اسم المجموعة التشابكية
صوران	67	AG1
محجة	13	AG3
داعر	14	AG3
تل حسين	15	AG3
شقرا 1	16	AG3
شقرا 2	17	AG3
مارع	18	AG3
عين جارة	19	AG3
كوسنيا(سلمى)	20	AG3
سموقة	21	AG3
تركمان بارح	22	AG3
احرص	23	AG3
تل حدية	24	AG3
كفركلبين	25	?
حيلان	26	AG3

الساعد	27	**AG3**
كفرناصح	28	**AG3**
بحورته	29	**AG3**
كفر انطون	30	**AG3**
ديوان تحتاني	31	**AG3**
طعانة	32	**AG3**
بحورته	33	**AG3**
وحشية	34	**AG3**
كوسنيا	35	**AG3**
تل مالد	36	**?**
منصورة	37	**AG3**
طرندة	38	**AG3**
تل رفعت	39	**AG3**
تل رفعت	40	**AG3**
جينه	41	**AG3**
بنش	42	**AG3**
أتارب	43	**AG3**
كتيان	44	**AG3**
لوف	45	**AG3**
سراقب م	46	**?**
ترمانين	47	**AG3**
كفر حلب	48	**AG3**
زردنا	49	**AG3**
تل تونة	50	**AG3**
كفرتعنور	51	**AG3**
سراقب ب	52	**?**
تفتناز	53	**AG3**
معارة	54	**AG3**
كفريا	55	**AG3**
ديمو ب	56	**AG3**
صفصافية	57	**AG3**
معرد فتين	58	**?**
آشير	59	**?**
شيزر	60	**AG3**
تل شور	61	**AG3**
كفرنبودة	62	**?**
محردة	63	**AG3**
تل سكندا	64	**AG3**
ديمو	65	**AG3**
السمرة	66	**AG3**



الشكل 13: **التشابك بين هيفا المجموعة التفريقية والعزلة المجموعة باستخدام صبغات مختلفة.**

2.1.3 اختبار القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية AGs مخبرياً

تباينت المجموعات التشابكية فيما بينها من حيث سرعة النمو، ولون الأجسام الحجرية، وقدرتها الإمراضية على البطاطا، وكذلك الأعراض التي أحدثتها على النبات ومناطق الإصابة، كما تباينت بكثافة الأجسام الحجرية وسرعة نمو الميسيليوم الذي تنتجه. الجدول (17).

جدول 17: **تفاعل المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* مع الصنف القابل للإصابة (بينيلا) ولون الأجسام الحجرية لهذه المجموعات وكثافتها.**

المجموعة التشابكية	التفاعل مع الصنف القابل للإصابة(بينيلا)	لون الأجسام الحجرية/بعد 37 يوماً على وسط PDA
AG1	ذبول النبات، تقرح التاج، تحلل للجذور، نكرزات على الساق، مهاجمة المدادات	سوداء ويوجد بكثافة
AG2-1	تقرح التاج، مهاجمة المدادات وتحللها, تحلل الجذور	بنية برتقالية ويوجد بكثافة
AG2-2	تحلل الجذور، تقرح التاج، نكرزات على الساق، مهاجمة المدادات	بني ويوجد بكثافة
AG3 potato	تقرح كامل التاج، مهاجمة المدادات, تحلل الجذور	بني فاتح ويوجد بكثافة
AG3	نكرزات على الساق, تقرح التاج, تقرح الجذور.	بني فاتح ويوجد بكثافة
AG4HGII	نكرزة التاج, مهاجمة المدادات, تحلل الجذور.	بني ويوجد بكثافة
AG5	تقرح كامل التاج، مهاجمة المدادات وتقرحها, تقرح الجذور	بني – عددها قليل جداً
AG6	تقرح التاج , تقرح المدادات, تحلل الجذور	بني – متوسط الكثافة
AG8	نكرزات خفيفة على الساق, تقرح التاج, مهاجمة الجذور.	بني– قليل جداً
AG9	تقرح التاج, مهاجمة المدادات, تحلل الجذور, نكرزة الدرنات.	بني– قليل جداً
AG12	تقرح التاج, مهاجمة الجذور.	بني– قليل جداً
AG4HGI	نكرزة الساق, نكرزة المنطقة التاجية, مهاجمة المدادات, مهاجمة الجذور.	بني رمادي قليل جداً

ووجد أن جميع المجموعات التشابكية المدروسة في هذا البحث كانت ممرضة، وأحدثت إصابة على بادرات البطاطا ضمن ظروف المختبر. حيث شكلت المجموعة التشابكية AG1 أجساماً حجرية سوداء تميزها عن المجموعات الأخرى للنوع *R. solani* أما المجموعة AG4HGI فشكلت أجساماً حجرية ذات لون بني رمادي، أما المجموعات الأخرى فتدرجت ألوان أجسامها الحجرية من بني فاتح إلى بني إلى بني برتقالي. أيضاً تباينت لون الأجسام الحجرية ضمن المجموعة الواحدة، فاختلف لون الأجسام الحجرية التي تشكلها المجموعة AG4HGI عن تلك التي شكلتها AG4HGII، وهذا موضح في الجدول (17).

وشكلت كل من المجموعات AG1، AG2-1، AG2-2، AG3P، AG3، AG4HGII الأجسام الحجرية بكثافة عالية، في حين شكلت المجموعة AG6 هذه الأجسام بكثافة متوسطة، وكانت هذه الأجسام قليلة جداً عند كل من المجموعات AG4HGI، AG5، AG8، AG9، .AG12.

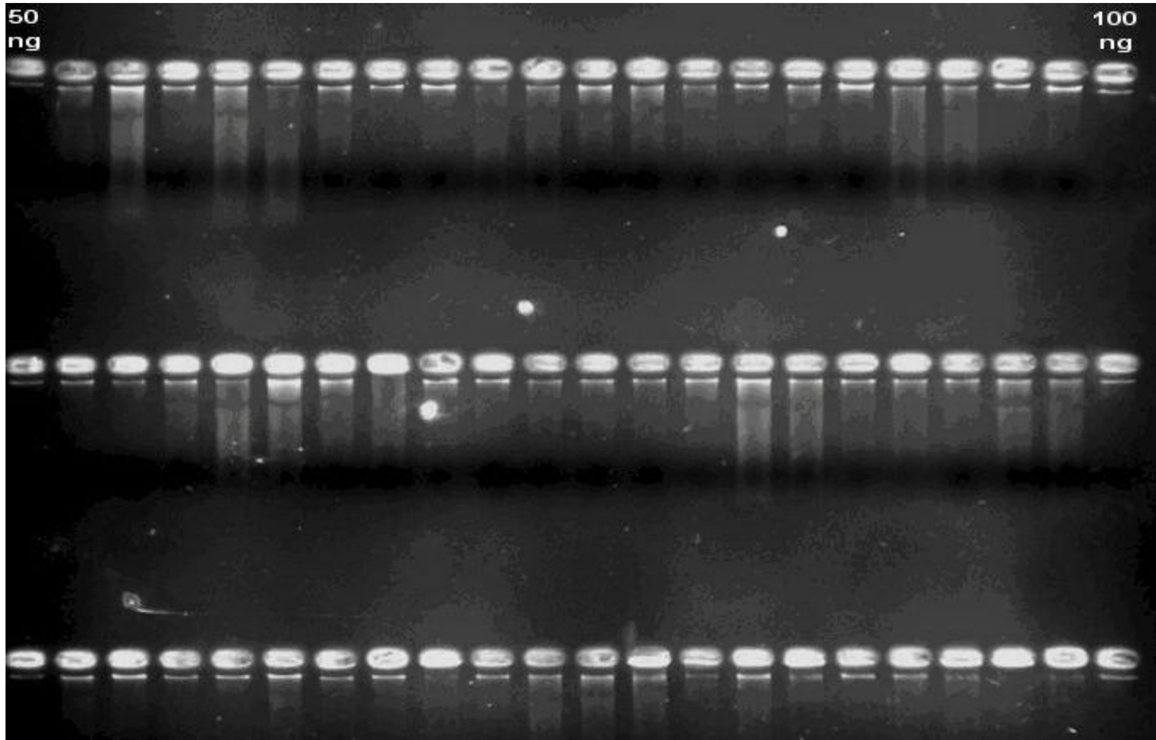
تباينت المجموعات فيما بينها في سرعة نمو الميسيليوم فكانت المجموعات التشابكية الأسرع هي: AG1، AG2-2، AG3-P حيث ملأ نموها الطبق خلال 3 أيام، في حين استغرقت المجموعات-AG2 1، AG4HGII، AG5، AG6، AG8، AG9 4 أيام، أما المجموعاتAG3 وAG4HGI، وAG12 فاستغرقت 5 أيام. الجدول (18).

جدول 18: متوسط **سرعة النمو (مم/اليوم) للمجموعات التشابكية للفطر *R. solani* على وسط PDA:**

متوسط سرعة النمو مم/ اليوم	المجموعة التشابكية AGs
26.6	AG1
20	AG2-1
26.6	AG2-2
26.6	AG3P
16	AG3
20	AG3R
20	AG4GHII
20	AG5
20	AG6
20	AG8
20	AG9
16	AG12
16	AG4GHI

2.3 نتائج الطرائق الجزيئية

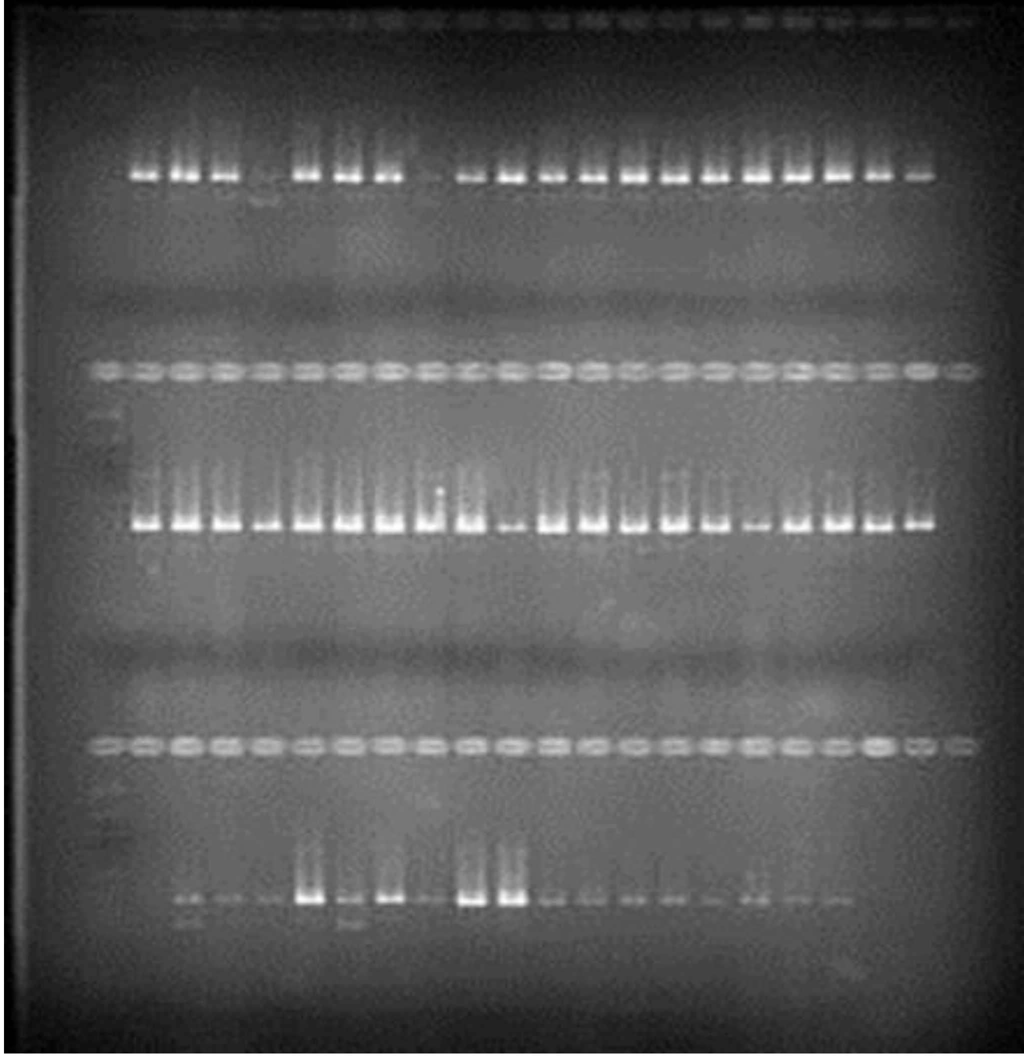
استخدمت الطرائق الجزيئية لتعزيز النتائج المتحصل عليها من طريقة تشابك الهيفات، فبعد استخلاص الـــ DNA، قدر تركيز الـــ DNA لعزلات المسح الحقلي والمجموعات التفريقية بعد عملية الرحلان الكهربائي، حيث قُدرت كمية الـــ DNA لكل عزلة في 1 ميكرولتر. وتفاوت تركيز الـــ DNA للعزلات، بحيث وحدت تراكيز جميع العزلات لتصبح 20 نانوغرام/ ميكرولتر.أيضاً تميزت عملية الإستخلاص بنوعية جيدة دلالة على عدم وجود تقطيع ضمن مسار كل عينة.



الشكل 14: **تركيز الـــ DNA للعزلات والمجموعات التشابكية على هلام الأغاروز1%.**

1.2.3 تضخيم الـــDNA بوساطة التفاعل السلسلي البوليميرازي (PCR) وباستخدام بادئات SSR متخصصة

لم نتمكن من خلال هذا البحث التمييز بين العزلات السورية بالإضافة للعزلات التفريقية باستخدام تقنية SSR، حيث أن هذه البادئات لم تمكننا من التمييز بين العزلات التفريقية والعزلات التي تم جمعها خلال عملية المسح الحقلي، نظراً لعدم وجود تباين بين العزلات التفريقية وعزلات المسح الحقلي حيث أعطت جميعها حزماً أحادية الشكل Monomorphic.



الشكل 15: **صورة الهلام باستخدام زوج البادئات لــ AG3P وفقاً لتقنية SSR.**

2.2.3 استخدام تقانة مكاثرة القطع المتباينة الناتجة عن التجزيئ الأنزيمي Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

استخدم في البداية 15 توليفة، وتم اختيار التوليفتين P12/M43 و P100/M43، كونهما أبديتا تبايناً بين العزلات المختبرة أكثر من التوليفات الأخرى السابقة الذكر، أيضاً أظهرت عصابات للــ DNA أكثر من التوليفات الأخرى.

أظهرت قراءة الهلامة وجود 676 عصابة DNA: 359 و317 عصابة ناتجة عن التوليفتين P12/M43 وP100/M43 على التوالي.

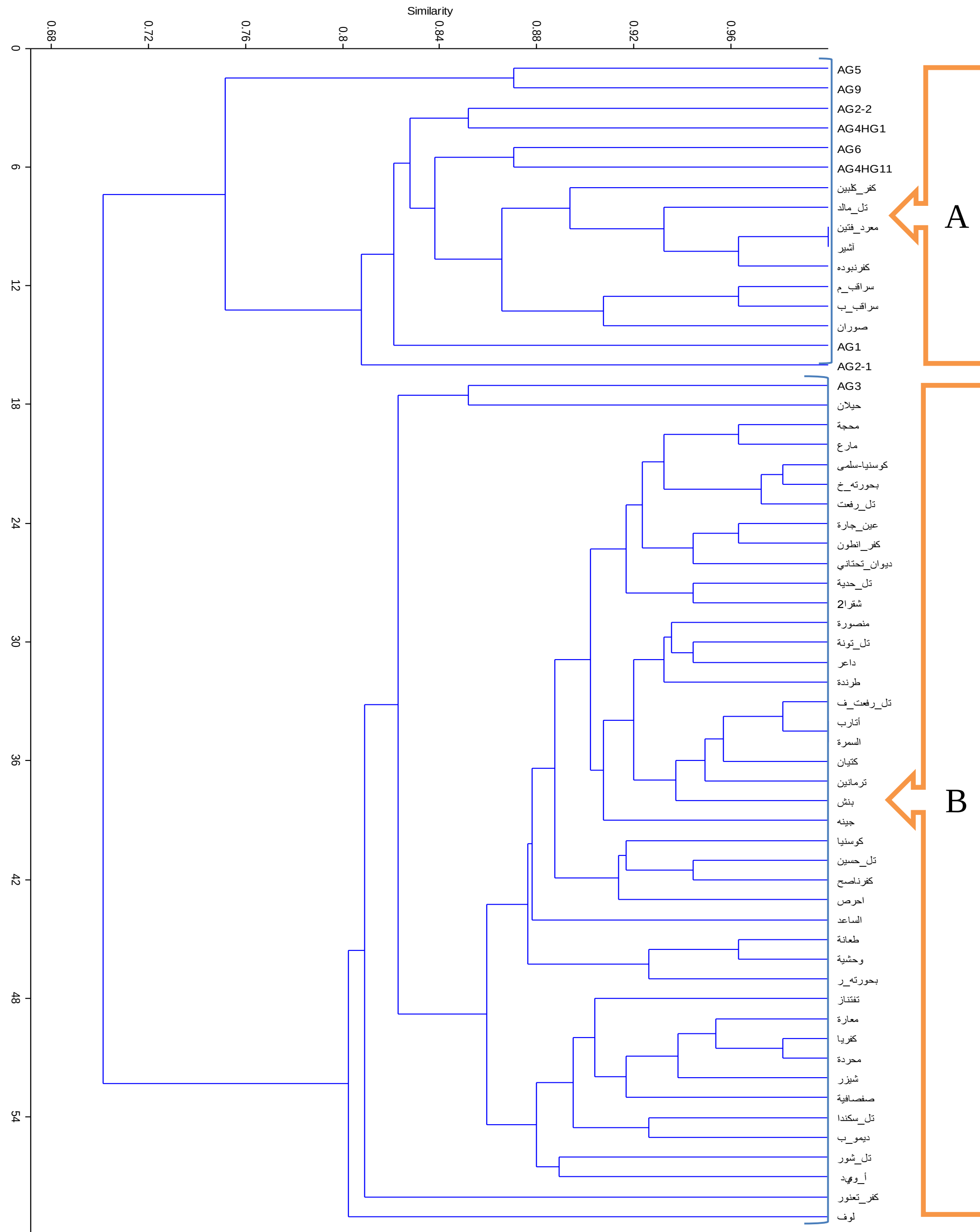
سجل عدد المؤشرات التعددية الشكلية Polymorphic Markers 37 مؤشراً بنسبة 68.52% و17 مؤشراً بنسبة 31.48% إلى المؤشرات الكلية للتوليفتين P12/M43 وP100/M43 على التوالي.

أمكن باستخدام التحليل الإحصائي المعتمد على حزم DNA المتضخمة باستخدام مصفوفة التشابه الوراثي لمعامل Hamming رسم الشجرة الوراثية Dendrogarm والتي تمثلت بمجموعتين رئيسيتين، ضمتا 50 عزلة من *R. solani* (عزلات المسح الحقلي) بالإضافة للعزلات التفريقية، أيضاً أمكن معرفة هوية العزلات وانتماءها لمجموعة تشابكية معينة، ومدى التشابه بين العزلات التابعة للمجموعة الواحدة. مثلت المجموعة الأولى والثانية 16% و84% على التوالي من مجموع العزلات الكلية.

انقسمت المجموعة الأولى إلى تحت مجموعتين وكانت نسبة التشابه بين هاتين المجموعتين حوالي75%، حيث مثلت تحت المجموعة الأولى المجموعتين التشابكيتينAG5، AG9 وكانتا متشابهتين بنسبة أعلى من 86% حسب التوليفتين المستخدمتين، أما تحت المجموعة الثانية التابعة للمجموعة الأولى فمثلت بـــ AG1، AG2-1، AG2-2، AG4HGI، AG4HGII، AG6 بالإضافة لـــ 8 عزلات وبنسبة تشابه أكثر من 80 %، وهذه العزلات هي عزلات: كفركلبين، معردفتين، آشير، كفرنبودة، سراقب ب، سراقب م، صوران، تل مالد. علماً أنه تبعاً لطريقة تشابك الهيفا، وجد أن العزلة صوران انتمت للمجموعة التشابكية AG1، ووجد أن العزلتين آشير ومعرد فتين كانتا متشابهتين بنسبة 100% بالنسبة للتوليفتين المستخدمتين، وتضمنت المجموعة الأولى 4 عزلات من حماه بنسبة 33% من عزلات حماه، وعزلتين من حلب 9% من عزلات حلب، وعزلتين من إدلب بنسبة 15% من عزلات إدلب.

أما المجموعة الثانية فانقسمت إلى تحت مجموعات: 8 عزلات من حماه بنسبة 67%من عزلات حماه، و20 عزلة من حلب بنسبة 91% من عزلات حلب، و11 عزلة من إدلب بنسبة 85%، في حين انتمت جميع عزلات دمشق وهي ثلاث للمجموعة الثانية وبنسبة 100%، وانتمت جميع عزلات المجموعة الثانية لمجموعة تشابكية واحدة فقط وهي المجموعة AG3، المجموعة التشابكية الأكثر شيوعاً على البطاطا، مع وجود تباين بين العزلات التابعة للمجموعة الواحدة، وتراوحت نسبة التشابه بين المجموعة AG3 والعزلات التابعة لها بأكثر من 80%، مع وجود عزلتين متشابهتين بنسبة تشابه 100% وهما عزلتي أتارب والسمرة تبعاً للتوليفتين المستخدمتين.

استخدم أكثر من معامل، واعتماداً على مصفوفة الاختلاف الوراثي، حُسب معامل Jaccard لدراسة التباين الوراثي بين العزلات السورية والعزلات التفريقية، وأعطت نتائج مقاربة لنتائج معامل Hamming.



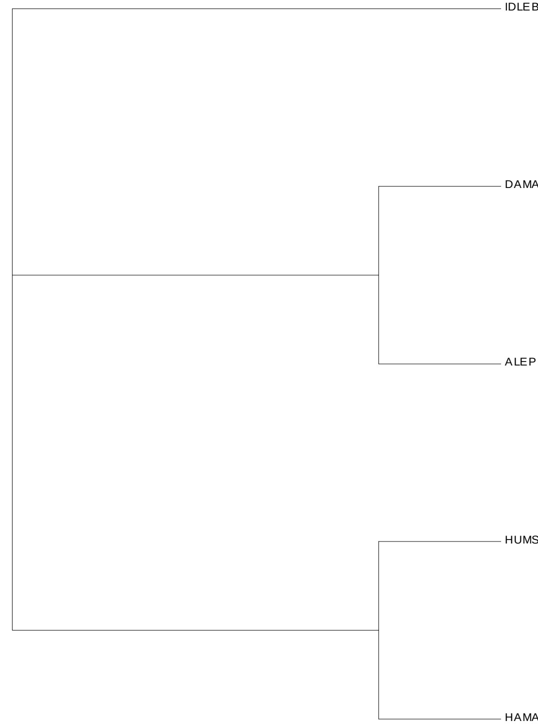
الشكل 16: الشجرة الوراثية ومدى التقارب بين العزلات والمجموعات التشابكية.

اعتماداً على بيانات الـــ DNA ، أخذ متوسط معامل التشابه الوراثي بين عزلات كل محافظة على حده، وبين عزلات كل محافظة والمحافظات الأخرى، وبين كل العزلات بغض النظر عن المحافظة التي انتمت إليها، كما أخذ متوسط معامل التشابه الوراثي بين المجموعة التشابكية AG3 وعزلات كل محافظة، وبين المجموعة التشابكية AG3 والعزلات السورية بغض النظر عن المحافظة وذلك حسب التوليفتين المستخدمتين، مع استبعاد العزلات التي أعطت قيماً متطرفة، وتم ضم عزلة حمص الوحيدة

لعزلات حماه. بلغت أعلى قيمة لمتوسط معامل التشابه الوراثي عند عزلات محافظة حلب وهي 62.56%، أما أدناها فكانت عند عزلات حماه 36.27%، علماً أن قيمة متوسط معامل التشابه الوراثي بين عزلات دمشق كانت أعلى ولكن لم يؤخذ بعين الإعتبارنظراً لقلة العينات. في حين بلغت أعلى قيمة لمتوسط معامل التشابه الوراثي بين المحافظات 65.57% وكانت بين عزلات محافظتي حلب ودمشق، في حين كانت أدناها بين عزلات إدلب وحماه 38.25%. كما حسبت قيمة متوسط معامل التشابه الوراثي بين العزلات السورية بغض النظر عن المحافظة وبلغت 48.6 %. وبناءً على متوسط معامل التشابه الوراثي، نجد أن المجموعة التشابكية AG3 كانت أقرب لعزلات حلب أكثر من عزلات المحافظات الأخرى بنسبة بلغت 42.98%، في حين كانت أبعد عن عزلات حماه بنسبة تشابه 24.19%. وهذا موضح في الجدول (19).

جدول 19: **يوضح متوسط معامل التشابه الوراثي بين عزلات كل محافظة على حده، وبين عزلات كل محافظة والمحافظات الأخرى، وبين كل العزلات بغض النظر عن المحافظة، ومتوسط معامل التشابه الوراثي بين المجموعة التشابكية AG3 وعزلات كل محافظة، وبين المجموعة التشابكية AG3 والعزلات السورية بغض النظر عن المحافظة**

	AG3	Damas	Aleppo	Idlib	Hama	Syria
Damas	%40.46	% 69.3				
Aleppo	%42.98	%65.57	%62.56			
Idlib	%29.21	%51.79	% 49.66	%46.96		
Hama	%24.19	%41.09	% 40.11	% 38.25	%36.27	
Syria	%34.39					%48.6



الشكل 17: **مدى التشابه بين عزلات المحافظة التي جرت عليها عملية المسح الحقلي.**

4. المناقشة

1.4 تحديد فئات المجموعات التشابكية Identification of AGs

1.1.4 تشابك الهيفا

أظهرت النتائج واعتماداً على تقنية تشابك الهيفا أن معظم العزلات التي تم عزلها من الحقول السورية قد انتمت للمجموعة AG3. وتأتي هذه النتيجة موافقة لنتائج سابقة أشارت إلى أن المجموعة AG3 هي المجموعة السائدة في حقول البطاطا عالمياً(Cubeta *et al.*, 2000; Ritchie *et al.*, 2006)، وانتمت عزلة واحدة فقط هي عزلة صوران (67) للمجموعة AG1، وهذا يتفق مع Bandy وآخرون (1988) الذين عزلوا المجموعة AG1 من جذور البطاطا أيضاً. ووجد، في فنلندا، أن جميع العزلات المعزولة من البطاطا تنتمي للمجموعة AG3، وتبعاً لتشابك الهيفا وجد أن جميعها تنتمي للتصنيف C3 (Lehtonen, 2009). أيضاً استخدمت هذه التقنية لتحديد عزلات *R. solani* المعزولة من حقول البطاطا في وسط المكسيك (Virgen- Calleros *et al*., 2000). كما تتوافق نتائجنا مع النتائج المتحصل عليها في بريطانيا حيث وجد أن العزلات تنتمي لــ AG3 واعتماداً على تشابك وانصهار الهيفا اعتمد على النمطين C2 وC3 حيث انتمت معظم العزلات (92.6%) إلى المجموعة AG3 PT، بينما انتمى بعضها (6.7%) إلى المجموعة AG2-1، في حين انتمت عزلة وحيدة فقط (0.7%) إلى المجموعة AG5 (Woodhall *et al*., 2007). وحصل (Campion *et al*., 2003) على نتائج مماثلة في فرنسا اعتماداً على تشابك الهيفا، كما حصل Chand &Logan (1983) على نتائج

مقاربة في شمال ايرلندا. وفي الطقس الدافئ لفنزويلا، وجد Cedeno وآخرون (2001) أن النسب كانت متماثلة للـــ AG3 وAG2-1. أما في باكستان، فكانت معظم عزلات الفطر *R. solani* المجموعة من مناطق زراعة البطاطا تنتمي للمجموعة التشابكية AG3 (81.89%) و8.66% للمجموعة AG5 و5.5% للمجموعة AG4 و1.57% للمجموعة AG2-1 و0.79% لكل من المجموعات AG1-1A وAG2-2 وAG9 (Rauf *et al*., 2007). وفي ولاية ميشيغان الأمريكية، وجدت ثلاث مجموعات تشابكية هي: AG2-2 وAG3 وAG4، واعتبرت المجموعة التشابكية AG3 هي الممرضة للبطاطا، بينما سببت المجموعة AG2-2 تعفن التاج والجذور للشوندر السكري، وأحدثت المجموعة AG4 ذبول بادرات الشوندر السكري (Wharton *et al*., 2007). وتكون AG3 أكثر شراسة في الظروف الباردة، كبعض أجزاء من أمريكا الشمالية مثل كندا، وشمالي ووسط أوروبا (Otrysko *et al*., 1985; Bandy *et al*., 1988; Carling & Leiner, 1990b; Bains & Bisth, 1995; Justesen *et al*., 2003; Campion *et al*., 2003). وفي المناطق الدافئة والمنخفضة من البيرو كانت AG4 المجموعة التشابكية السائدة والملازمة لأضرار الساق (Anguiz & Martin., 1989) وماسبق يتعارض مع نتائج Carling & Leiner (1986) اللذين وجدا بأن AG4 لا توجد على البطاطا في ألاسكا في الولايات المتحدة، مقترحين بأن المناخ قد يكون هاماً في سيادة مجموعات تشابكية معينة. لكن من المحتمل أيضاً أن تكون العمليات الزراعية عاملاً مهماً في سيادة مجموعات تشابكية خاصة (Woodhall *et al*., 2007). في حين أن AG4 تكون سائدة في المناطق الدافئة ذات الإرتفاعات المنخفضة في بيرو(Carling *et al*., 1998). وعلى الرغم من تسجيل AG3 كمسبب رئيس لتقرح الساق والقشرة السوداء على البطاطا في وسط وشرق مناطق الأناضول في تركيا عام 1990، فقد تم عزل مجموعات تشابكية أخرى (AG2-1، AG2-2، AG-4، AG5) من سوق ودرنات البطاطا المصابة بتقرح الساق (Demirci & Doken, 1993; Yanar *et al*., 2005). وتشير دراسات سابقة إلى أن المسببات الرئيسة لتقرّح الساق في البطاطا تنتمي للمجموعة التشابكية AG3 (Bandy *et al*., 1988; Carling & Leiner, 1986, 1990b) وسجلت أيضاً مجموعات تشابكية أخرى مثل (AG-1، AG2-1، AG-4، AG-5، AG-9) مسببةً تقرح الساق وكذلك القشرة السوداء على البطاطا بآن واحد (Carling & Leiner, 1986; Chang & Tu, 1980; Carling *et al*., 1987; Anguiz & Martin, 1989; Bandy *et al*., 1988).

وقد يعزى سبب تشابك بعض عزلات المسح الحقلي مع أكثر من مجموعة إلى وجود مجموعـــة AG-BI (مجموعة التجسير) والتي سجلت في اليابان (Carling & Sumner, 1992) والتي تمتلك المقـــدرة على التشابك مع المجموعات AG2، AG3، AG6، AG8، ومؤخراً افتـــرض Carling ورفاقـــه أن تكون هذه المجموعة تحت المجموعة AG2، وتسمى بـــ AG2-BI (Carling *et al*., 2002b). أمـــا

العزلات التي ظهرت بلون أسود بعد ثلاثة أيام من زراعتها على وسط PDA، فهي تشبه مجموعة تابعة لـ AG1 هي المجموعة AG-1-1B التي تشكل أجساماً حجرية صغيرة microsclerotia ومن المرجح انتماء تلك العزلات لهذه المجموعة، ويكون سبب تحول لون الميسيليوم للأسود في هذه الحالة عائد إلى تشكل الأجسام الحجرية الصغيرة (Carling &Sumner, 1992)، ولكن الإحتمال الأكبر أن تنتمي للمجموعة AG-13 والتي يتميز الميسيليوم التابع لها بظهور حلقات مركزية مرئية من النمو بعد مرور 3–4 أيام، ولكنها تختفي مع الزمن، ويصبح الوسط أسود اللون (Carling *et al.*, 2002a).

إن تحديد العلاقة بين العزلات اعتماداً على تشابك الهيفا، طريقة غير دقيقة، كون الفطر يأخذ أنماطاً مختلفة من تشابك الهيفا، حتى ضمن المجموعة الواحدة (Gonzalez *et al.*, 2001). وعلى الرغم من أن الدراسات الجزيئية قد أسهمت في فهم البنية الوراثية والتنوع في مجتمع *Rhizoctonia*، إلا أننا بحاجة لمعرفة المزيد عن تنوع *Rhizoctonia* (Pascual *et al.*, 2000).

2.1.4 اختبار القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية AGs مخبرياً:

تباينت المجموعات التشابكية AGs لـ *R. solani* في الأعراض التي أحدثتها على بادرات البطاطا تحت ظروف المختبر، وأظهرت معظم المجموعات التشابكية أعراضاً على بادرات البطاطا رغم وجود تباين في مكان الإصابة على النبات. وتأتي الأعراض التي سببتها المجموعة AG2-1 من مظاهر الساق السلكية، وتعفن الجذور موافقة لنتائج (Carling & Sumner, 1992; Anderson, 1977)، وتأتي الأعراض التي سببتها المجموعة AG4 من تقرح للساق وتقرح وتحلل للجذر متوافقة مع نتائج (Vincell & Herr, 1992; Carling & Sumner, 1992; Anderson, 1982; Kulik & Dery, 1995)، أيضاً الأعراض التي سببتها المجموعة AG5 من تحلل للساق والجذر لنبات البطاطا موافقة لنتائج (Carling & Sumner, 1992). وعلى الرغم من ذكر Carling وأخرين أن المجموعة AG12 هي من الفطور الجذرية (Carling *et al.*, 1999)، إلا أنها أحدثت إصابة على التاج والجذور ضمن ظروف المختبر.

وذكر في الدراسة المرجعية (Sneh *et al.*, 1991) أن المجموعات AG6، AG7، AG10 هي مجموعات غير ممرضة، في حين ورد في دراسات أخرى أن المجموعة AG6 ممرضة وتحدث تعفناً لجذور الفريز (Botha *et al.*, 2003)، وتعفن الجذر على القمح (Meyer *et al.*, 1998) إلا أنه تبين خلال هذا البحث وضمن ظروف المختبر، أن المجموعة AG6 أحدثت إصابة على بادرات البطاطا على الصنف بينيلا. أما المجموعتين AG7، AG10 فلم نتمكن من الحصول عليهما.

في دراسة لــ Ritchie ورفاقه (2009) وجد أن المجموعتين AG2-1 وAG3 المأخوذتين من البطاطا لهما مجال pH واسع يتراوح من4–8، وذلك على الأوساط المنظمة buffered media، ووجد أن المجموعة AG2-1 تنتج أجساماً حجرية ضمن مجال ضيق من pH 5–6، في حين أن AG3 تنتجها ضمن مجال أوسع 4–8. وأثبتت هذه الدراسة أن pH المثلى هي 5.6. وبالتالي فإن الوسط MS هو وسط مثالي لنمو الفطر *R. solani*. وفي دراسة أخرى وجد أن المجال 3.5–7.5 هو المفضل لنمو ميسيليوم *R. solani* على الــ poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) (Bateman, 1962). كما وجد Grosch ورفاقه (2003) أن pH المثلى لنمو ميسيليوم AG1-1B المعزولة من الخس تراوح من5–6.

تباينت المجموعات التشابكية فيما بينها بلون الأجسام الحجرية وكثافتها وبسرعة نمو الميسيليوم الذي تنتجه، مؤيدة للنتائج المخبرية لــ Woodhall ورفاقه (2008) حيث أعطت عزلات المجموعة AG3 PT أجساماً حجريةً على وسط بطاطا ديكستروز آجار (PDA) أكثر بشكل معنوي مما أعطته عزلات المجموعات AG2-1 و4 و5 و8. ولم يحدد Woodhall ورفاقه المجموعة التشابكية AG4 بدقة، حيث شكلت المجموعة AG4HGII في تجربتنا أجساماً حجرية وبكثافة، في حين شكلت المجموعة AG4HGI أجساماً حجرية ولكن بنسبة قليلة جداً، ووجد أن المجموعة AG3 استغرقت فترة أطول نسبياً من بعض المجموعات، وهذا ما أكد عليه Carling وٍSumnar أن نمو المجموعة AG3 يكون أبطأ من المجموعات الأخرى (Carling & Sumnar, 1992)

2.4 الطرائق الجزيئية

تعتبر تقانة الــ SSR من التقانات الجزيئية المهمة المستخدمة في دراسات التنــوع الحيــوي ورســم الخرائط الوراثية والدراسات التفريقية بين الأجناس والأنواع وتحت الأنواع على مستوى الــــDNA. وحتى تكون تلك الدراسات ناجعة ومفيدة في هذا المجال، يجب استخدام عدد لا بأس بــه مــن هــذه المؤشرات (SSR) لتغطية أكبر قدر ممكن من المجموع الوراثي للعينات المدروســة. إن مؤشــرات SSR تعتبر نوعية ومحددة. هذا وإن مؤشرات SSR الخاصة بفطر *R.solani* هي قليلة العدد نســبياً، ومع ذلك فقد تم استخدامها في هذا البحث بداية على أمل الحصول على معلومات وراثية مهمة ومفيدة. لكننا لم نتمكن من التمييز بين العزلات السورية والعزلات التفريقية باستخدام تقانة SSR، علماً أن هذه التقانة استخدمت من قبل Bjorstad & Roed (2001) اللذين لاحظا وجود تنــوع ضــمن عــزلات *R.solani*. وقد يعزى السبب في إخفاقنا بهذا التمييز في الدراسة الحالية إلــى العــدد المحــدود مــن مؤشرات الــ SSR التي تمكنا من تطبيقها هنا. كما

استخدمت التقنية أيضاً من قبل Mwang ʼOmbe ورفاقه (2007), في كينيا، لتمييز عــزلات الفطــر *R.solani*، ولوحظ وجود تنوع وراثي ضمن مجتمع الفطر المذكور، .على أنهم أخفقوا في إيجاد علاقة بين مواقع SSR والمنشأ الجغرافي لعزلات الفطر.

ونظراً لعدم كفاية المعلومات الوراثية التي تم الحصول عليها باستخدام تقانة الــSSR في التمييز بــين العزلات، تم استخدام تقانة أخرى وهي تقانـــة مكـــاثرة القطـــع المتباينـــة الناتجـــة عـــن التجزيـــئ الأنزيمي(Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP فقد أثبتت دراســـات ســـابقة أن تقنية AFLP هي طريقة موثوقة يمكن الاعتماد عليها لتميز المجموعـــات التشـــابكية لــــ *R.solani*. (Olmos-Lopez *et al.*,2005).

ساهمت استخدام تقانة AFLP في هذا البحث في تحديد هوية عزلات *R. solani* التي تم جمعها من حقول البطاطا، والمعزولة من أجزاء نباتية مختلفة، ومعرفة المجموعة التشابكية التي تنتمي إليها . إذ بينت النتائج أن معظم العزلات تنتمي للمجموعة التشابكية AG3، بالإضافة لمجموعات تشابكية أخرى. وهذا ماأكدته دراسات عديدة ذكرت أن المجموعة التشابكية AG3 هي المجموعة المتخصصة على البطاطا (Shew & Melton,1995؛ Kuninaga *et al.*,1997؛Ceresini *et al.*,1999). ووجد تنوع وراثي ضمن مجتمع *R. solani* على البطاطا والتابعة للمجموعة AG3, حيث كان هناك تباين في نسب التشابه بين هذه العزلات، وهذا يتفق مع أبحاث أخرى سابقة، حيث استخدمت تقانة AFLP في تحديد التنوع الوراثي ضمن مجتمع *R. solani* للمجموعة AG3 على البطاطا والتبغ في ولاية كارولينا الشمالية، ووجد تنوع وراثي ضمن عزلات البطاطا أكثر من عزلات التبغ (Cereseni *et al.*,2002) كما تأتي هذه النتيجة مؤيدة لنتائج أخرى في جنوب استراليا والتي أكدت وجود تنوع وراثي بين عزلات AG3 المعزولة من البطاطا (Balali *et al.*,1996)

في حين لم نتمكن من تحديد هوية 8 عزلات ، وكانت أقرب للمجموعات التشابكية AG1، AG2-1، AG2-2، AG4HGI، AG4HGII، AG6 أكثر من المجموعتين التشابكيتين AG5، AG9، وأكدت دراسة في فنلندا، اعتماداً على تقانة AFLP، أن AG3 هي المجموعة الرئيسية لــ *R. solani* على البطاطا بالإضافة لمجموعات تشابكية أخرى مثل AG2-1، AG-4، AG-5 (Lehtonen, 2009).

سجلت دراسات عديدة أن المجموعات AG2-1، AG-4، AG5 تكون مرافقة للبطاطا، وأنها كانت من العزلات الشرسة، وقادرة على إحداث أعراض رايزوكتونيا على البطاطا (. (Abe & Tsuboki, 1978; Chang & Tu, 1980; Chand & Logan, 1983; Carling & Leiner, 1986; Anguiz &

Martin, 1989; Carling & Leiner, 1990a; Bains & Bisht, 1995; Balali *et al.*, 1995; .Cedeño *et al.*, 2001; Truter & Wehner, 2004; Woodhall *et al.*, 2007)

وتأتي نتائج الدراسة الجزيئية مؤيدة لنتائج تشابك الهيفا، باستثناء عزلة صوران التي انتمت للمجموعة AG-1 اعتماداً على تشابك الهيفا، علماً أنه باستخدام هاتين التوليفتين كانت نسبة التشابه بين عزلة صوران والمجموعة AG-1 أكثر من 80% وكانت أقرب لهذه المجموعة من المجموعات التشابكية الأخرى، وهذا يعزى إلى المساحة التي غطتها التوليفتين من مجين الـــ DNA. أما بالنسبة للعزلات التابعة للمجموعة AG3 فوجد اعتماداً على تقانة AFLP أن هناك تبايناً في نسب التشابه فيما بينها، وتأتي هذه النتيجة أيضاً مؤيدة لنتائج تشابك الهيفا حيث كانت العزلات التي تنتمي لـــ AG3 تأخذ النمطين C2، C3.

كما أكد Laroche ورفاقه (1992) أيضاً وجود تنوع وراثي ضمن مجتمع *R. solani* ولكن باستخدام تحاليل الإيزوزيمات isozyme analysis.

الفصل الرابع

عزل الكائنات الدقيقة، البكتيرية والفطرية، التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *R. solani* المحدث لمرض القشرة السوداء على البطاطا

1 الدراسة المرجعية

تزايد الاهتمام بالمكافحة الأحيائية للفطر *R. solani* في السنوات الأخيرة. وقد أظهرت بعض طفيليات الفطور (Mycoparasites) كفاءة في خفض الإصابة بالفطر *R. solani* ونذكر من هذه الكائنات *Verticillium biguttatum* (van den Boogert & Velvis, 1992)؛ *Trichoderma harzianum*، *T. viridae*، *T. hamatum* و *Gliocladium virens* (Beagle-Risaino & Papavizas., 1985).

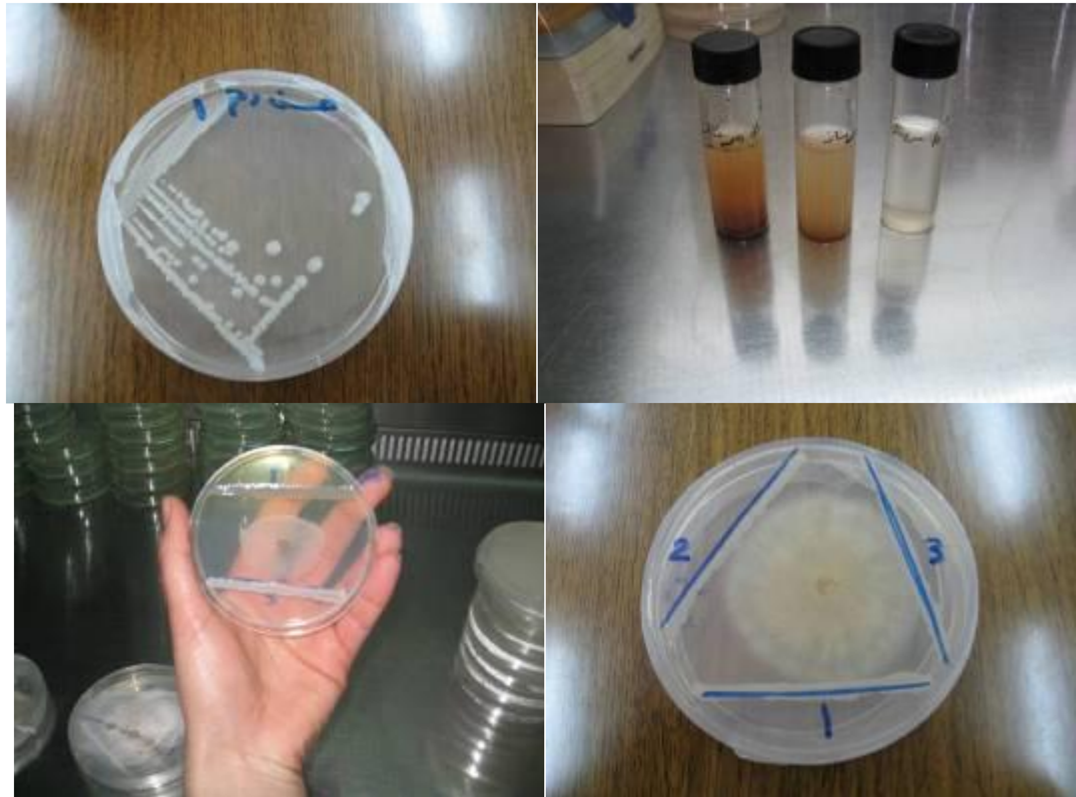
كما وجد أن بعض البكتيريا مثل السلالة RB14 من البكتيريا *Bacillus subtilis* تثبط نمو الفطر *R. solani* في المختبر وعلى بادرات البندورة. واستخدمت السلالة RB14-C *B. subtilis* والسلالة BY *Burkholderia cepacia* في توافيق لمكافحة ذبول البندورة، وأظهرت النتائج أن استخدامهما معاً يؤدي إلى وقف كبير للذبول أكثر من ذاك الذي يحدثه استخدام كلٍ منهما بمفرده (Asaka & Shoda, 1996). ومن عزلات المكافحة الحيوية الأخرى المعروفة: *Laetisaria arvalis*، *Cladorrhinum foecundissimum*، *Stilbella aciculosa*.

2 مواد العمل وطرائقه

1.2 عزل الكائنات البكتيرية التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *Rhizoctonia solani* المحدث لمرض القشرة السوداء على البطاطا

أخذ من كل عينة من العينات الترابية (حوالي 1 كغ لكل عينة) المجموعة من منطقة جو الجذور (على عمق 15–25 سم) 10 غ تربة بشكل عشوائي ونشرت على جريدة لتجف في الظل. طحنت العينات جيداً بعد 24 ساعة في هاون معقم من البورسلان حتى أصبحت ناعمة، وأخذ منها غرام واحد وأضيف إلى أنبوب يحوي 10 مل ماء مقطر معقم، ورج الأنبوب على جهاز Vortex لمجانسة المعلق، ثم خفف المعلق بإضافة 1 مل منه إلى أنبوب يحوي 9 مل ماء مقطر معقم، وكررت عملية التخفيف عدة مرات بشكل متتالي حتى الحصول على التخفيفات التالية: 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}. أخذ من كل تركيز 50 ميكرولتر بوساطة ماصة دقيقة مرتين، ونشرت على سطح طبقي بتري يحوي الأول وسط PDA والآخر على الآجار المغذي (NA) بوساطة قضيب باستور زجاجي مثلث الرأس. حضنت الأطباق عند 27±2 ْس لمدة ثلاثة أيام، حيث نما عديد من المستعمرات البكتيرية المختلفة.

فحصت الأطباق، وأعطيت لكل مستعمرة بكتيرية مفردة متميزة بخواصها المزرعية رقماً خاصاً، وسجلت خواصها المزرعية (يرجى العودة للملحق رقم 6) في سجل خاص (قطر المستعمرة، لونها، شكلها، تحدبها، لمعانها). خططت كل عزلة على طبق بتري جديد للتأكد من نقاوتها. ثم أجري اختبار التضاد الأولي للعزلات البكتيرية مع الفطر *R. solani* التابعة للمجموعة AG3 لمعرفة العزلات التي تتسم بصفة التضاد الحيوي إزاءه، حيث خططت كل 2–3 عزلات بكتيرية مختلفة على طبق بتري واحد على شكل مستقيمين متوازيين أو على شكل أضلاع مثلث غير متصلة، ووضع قرص بقطر 5 مم من عزلة تنتمي للمجموعة التشابكية AG3 التابعة للفطر *R. solani* في مركز الطبق، ثم حضنت هذه الأطباق عند 27±2 ْس لمدة ثلاثة أيام. أخذت نتيجة الاختبار بعد ثلاثة أيام، حيث اعتبرت كل عزلة بكتيرية منعت نمو الفطر إيجابية التضاد، واعتبرت كل عزلة نما عليها الفطر سلبية التضاد. حفظت العزلات إيجابية التضاد وأهملت العزلات سلبية التضاد.



الشكل 18:**استخدام التراكيز المختلفة للبكتيريا، والحصول على عزلات نقية لإجراء التخطيط الأولي لمعرفة العزلات البكتيرية المضادة إزاء المجموعة AG3 التابعة للفطر *R. solani*.**

1. اختبار التضاد

خططت كل عزلة بكتيرية إيجابية التضاد على وسط PDA بمكررين، على شكل قطرين متصالبين يقسما سطح الطبق البتري إلى أربعة أرباع متساوية، ووضع في وسط كل ربع قرص من

الفطر *R. solani* التابع للمجموعة AG3 بقطر 5 مم وبعمر ثلاثة أيام. حضنت الأطباق عند 27 ±2 ْس لمدة ثلاثة أيام. تم قياس القطر الصغير والقطر الكبير لمستعمرة الفطر *R. solani* النامية مقابل كل عزلة بكتيرية، وحسبت نسبة التضاد بتطبيق معادلتي Fokemma (Fokemma, 1976):

$$\text{نسبة المنع} = \frac{r2 - r1}{r1} \times 100 \quad،\quad \text{نسبة النمو} = \frac{r2}{r1} \times 100$$

حيث : r_1 = متوسط طول نصف القطر الأكبر؛ r_2 = متوسط طول نصف القطر الأصغر.

أجري تحليل التباين باستخدام برنامج Genstat 7 وفق ANOVA عند مستوى المعنوية 5%.

2.2 حفظ العزلات البكتيرية

لقحت كل عزلة بعد التأكد من نقاوتها على أنبوبين يحوي كلٍ منهما 10 مل من وسط المرق المغذي السائل Nutrient Broth (NB)، ووضعت الأنابيب على الهزاز (Shaker) لمدة 24 ساعة عند 27±2 ْس. ثم وضعت الأنابيب في المثقلة عند سرعة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة عند 25 ْس لفصل الوسط السائل وزيادة تركيز البكتيريا. أهمل الوسط السائل ونقل 0.8 مل من المعلق البكتيري المركز إلى أنبوب بلاستيكي يحوي 1 مل غليسيرول معقم بوساطة ماصة دقيقة. أغلقت الأنابيب وجونس المعلق بجهاز Vortex، حفظت الأنابيب في المجمدة عند − 26 ْس، واستخدمت فيما بعد لتحديد هوية البكتيريا الإيجابية التضاد مع الممرض المدروس.

.3.2 جهاز تحديد هوية البكتيريا(جهاز BIOLOG)

طريقة تحديد هوية البكتيريا أوتوماتيكياً:

سجل Bochner عام 1989 أن نظام BIOLOG يستخدم لتشخيص البكتيريا الموجبة والسالبة لغرام. يعتمد النظام على سلسلة تفاعلات مع 95 مصدر كربوني، متضمنة السكريات والأحماض العضوية والأحماض الأمينية، تنتج تفاعلات لونية.

يتألف نظام BIOLOG لتحديد الهوية من حاسوب ومقياس للكثافة الضوئية عند طول موجة 590 نانومتر، وبرنامج لتحليل البيانات، وقارئ أطباق، وأطباق خاصة بالبكتيريا الموجبة والسالبة لغرام. تخضع العزلات المختبرة التي تبدي قابلية عالية لامتصاص الرصاص إلى مرحلة تالية من أجل تحديد هويتها باستخدام هذه التقنية. وفق الخطوات التالية:

صبغة غرام:

تخضع العزلات المختارة لصبغة غرام للتأكد من تفاعلها بالنسبة لغرام.

تحضير اللقاح:

نميت العزلات المختبرة على وسط أجار مناسب (وسط الأجار المغذي) وحضنت لمدة 18- 24 ساعة عند 30- 35 ْس. وحضر المعلق بأخذ جزء من الخلايا البكتيرية من طبق الآجار بوساطة إبرة معقمة، ثم وضع في محلول تركيزه 0.85%من saline. تحدد مجالات التعكر للخلايا البكتيرية للعزلات المختارة باستخدام قطر العكارة لـــ BIOLOG في قطر 20 نانومتر للأنابيب الملقحة والحاوية على 0.85% saline عند 590 نانومتر. ويجب ضبط كثافة المعلق عند 3×10^{8} وحدة مشكلة للمستعمراتcfu/ml .

تحضير البكتيريا:

تملأ حفر الأطباق بـــ 150 ميكرولتر من المعلق البكتيري للعزلات المختارة، وتغطى هذه الأطباق بأغطيتها وتحضن عند 28-30 ْس لمدة 24 ساعة تحت الظروف الرطبة لتجنب التبخر من الحفر الخارجية للأطباق. وتؤخذ قراءة الأطباق عند مرشح filter 590 نانومتر وذلك باستخام قارئ الأطباق.

تحلل النتائج بوساطة بيانات GN BIOLOG (تبعاً للخطوة الأولى) لتحديد هوية العزلات البكتيرية. من أجل الاختلاف في الأنواع وتحت الأنواع، يستخدم برنامج تحليل المجموعات لـــ BIOLOG كدلالة على وجود قرابة بين المجموعات المختلفة للبكتيريا.

حفظ العزلات البكتيرية:

حفظت العزلات البكتيرية بتنميتها على وسط المرق المغذي وحفظها في الثلاجة. أخذت العزلات البكتيرية بعد التأكد من نقاوتها وخططت على ثلاثة أوساط هي: Blood Agar Base، و Eosin Methylene Blue Agar (EMB-Agar)، و-Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar (CLED-agar). حيث الوسط Blood Agar Base وسط عام للبكتيريا السالبة والموجبة لغرام، أما الوسط EMB-Agar فهو وسط انتخابي للبكتيريا السالبة لغرام، والوسط CLED Agar وسط انتخابي للبكتيريا الموجبة لغرام.

حضنت العزلات عند 37 ْس لمدة 22–24 ساعة. حضرت عكارة بأخذ جزء من البكتيريا بوساطة إبرة معقمة في 6 مل مصل معقم (Na Cl) حيث يكون التعكر McFarland.2 ويمكن اختبار عزلتين فقط لكل طبق. وزعت العينات في حفر الأطباق بمعدل 100 ميكرولتر، وأضيفت نقطتان من زيت بارافين للعمود 12 الأخير وغطيت الأطباق بأغطيتها وحضنت عند 35–37 ْس لمدة 22– 24 ساعة. أضيفت نقطتان من أنزيم الببتيداز إلى الأعمدة الأربعة الأولى وتركت لمدة 5 دقائق ثم وضعت في الجهاز لأخذ القراءة وتحديد هوية البكتيريا. فإما أن يعطي تفاعلاً إيجابياً أو سلبياً، مع كل حفرة خاصة بمادة معينة ويوضح الشكل توزع المواد ضمن كل حفرة للطبق الواحد.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PEP BZAR	PEP D-ALA	PEP L-ALA	PEP HPR	α-GLU	α-CHIT	β-FUC	ONC	TREF	MALF	RIBF	PAR URE
B	PEP APPA	PEP ASP	PEP GLYP	PEP GLYT	β-GLU	CHIT	DIP	FCO	MATF	SUCF	XYLF	PAR ODC
C	PEP LEU	PEP GLY	PEP LYS	PEP ARG	α-GAL	PGUR	PNPX	GLUF	SORF	INUF	TAGF	PAR ADH
D	PEP PYR	PEP PROL	PEP TYR	PEP PECO	PNPG	α-MAN	LIPC	MANF	RAFF	LACF	TURF	PAR DECO
E	PEP BZAR	PEP D-ALA	PEP L-ALA	PEP HPR	α-GLU	α-CHIT	β-FUC	ONC	TREF	MALF	RIBF	PAR URE
F	PEP APPA	PEP ASP	PEP GLYP	PEP GLYT	β-GLU	CHIT	DIP	FCO	MATF	SUCF	XYLF	PAR ODC
G	PEP LEU	PEP GLY	PEP LYS	PEP ARG	α-GAL	PGUR	PNPX	GLUF	SORF	INUF	TAGF	PAR ADH
H	PEP PYR	PEP PROL	PEP TYR	PEP PECO	PNPG	α-MAN	LIPC	MANF	RAFF	LACF	TURF	PAR DECO

الشكل 19: **طبق خاص بالبكتيريا الموجبة لغرام, وتوزع المصدر الكربوني ضمن حفر الطبق.**

جدول 20: **الأنزيمات الموجودة داخل حفر الطبق الخاص بالبكتيريا الموجبة الغرام والتي سيقرؤها الجهاز:**

Peptidases

يستخدم كأنزيم Trypsine	BZAR
Tripeptidase	APPA
Leucineamidase	LEU
Pyrase	PYR
D-Alanineaminopeptidase	D-ALA
Asparatylaminopeptidase	ASP
Glycineaminopeptidase	GLY
prolineaminopeptidase	PROL
L-Alanineaminopeptidase	L-ALA
Glycylprolineaminopeptidase	GLYP
Lysineaminopeptidase	LYS

Tyrosineaminopeptidase	TYR
Hydroxyprolineaminopeptidase	HPR
Glycyltryptophanaminopeptidase	GLYT
Arginineaminopeptidase	ARG
شاهد البيبتيداز	PECO
Glucosidases	
α- Glucosidas	α -GLU
β-Glucosidase	β -GLU
α- Galactosidase	α –GAL
ρ- Nitrophynel-β -galactosidase	PNPG
α-N–Acetylglucosamidase	α -CHIT
Chitinase	CHIT
ρ- Nitrophynel-β -glucuronidase	PGUR
α-Mannosidase	α -MAN
β-Fucosidase	β -FUG
Diphosphoesterase	DIP
β -Xylosidase	PNPX
Phospholipase	LIPC
Chromogenic substrate شاهد	ONC
Fermentations	
شاهد التخمر	FCO
Glucose	GLUF
Mannose	MANF
Trehalose	TREF
Mannit	MATF
Sorbit	SORF
Raffinose	RAFF
Maltose	MALF
Sucrose	SUCF
Inulin	INUF
Lactose	LACF
Ribose	RIBF
Xylose	XYLF
Tagatose	TAGF
Turanose	TURF
Decarboxylases	
Urease	URE
Omithinedecarboxylase	ODC
Argininedihydrolase	ADH
Decarboxylases شاهد	DECO

4.2 عزل الكائنات الفطرية التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *Rhizoctonia solani* المحدث لمرض القشرة السوداء على البطاطا

عزلت أنواع الفطر .*Trichoderma* spp من العينات الترابية التي تم جمعها خلال عملية المسح الحقلي كونها إحدى الفطور المهمة التي تستخدم في المكافحة الأحيائية للسيطرة على عديد من أمراض النبات (Lynch, 1990; Papavizas, 1992) وأن هناك أنواع عديدة من هذا الفطر التضادي لها تأثير في الفطر .*Rhizoctonia* sp (Lewis & Papavizas, 1987) ولدراسة التأثير التضادي للفطر .*Trichoderma* sp على الفطر المدروس، وضع قرص لكل من الفطر .*Trichoderma* sp والفطر الممرض *R. solani* للمجموعة التشابكية AG3 بعمر 7 أيام لكل منهما، على وسط PDA على الطبق ذاته تفصلهما مسافة 6 سم. حضنت الأطباق عند 24± 2 ْس بوجود إضاءة مستمرة مع الأخذ بعين الاعتبار وجود الشاهد. سجلت النتائج بقياس النمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض، كما قدرت درجة التضاد الحيوي تبعاً لسلم التقييس الخماسي (Bell *et al.*, 1982) التالي:

1. نمو مستعمرة الفطر التضادي *Trichoderma* sp. بشكل تام على مستعمرة الفطر الممرض *R. solani*.
2. نمو مستعمرة الفطر الممرض *R. solani* بشكل تام على مستعمرة الفطر التضادي *Trichoderma* sp.
3. نمو كل فطر لجهة الفطر الآخر وتوقفهما.
4. نمو مستعمرة الفطر التضادي *Trichoderma* sp. فوق مستعمرة الفطر الممرض *R. solani* مع تبوغ خفيف.
5. نمو مستعمرة الفطر التضادي *Trichoderma* sp. فوق مستعمرة الفطر الممرض *R. solani* مع تبوغ كثيف.

كما وضع قرص من الفطر الممرض للمجموعة AG3 أخذ، من مستعمرات بعمر 7 أيام، في مركز طبق حاوي على وسط PDA ووضع قرص من الفطر التضادي *Trichoderma* sp. في مركز طبق آخر حاوي على وسط PDA، ووضع الطبق الحاوي على الفطر الممرض فوق الطبق الحاوي على الفطر التضادي وثبت بإحكام باستخدام parafilm، حضنت الأطباق عند 24± 2 ْس بوجود إضاءة مستمرة.

أيضاً تم حساب سرعة النمو ونسبة التبوغ للفطر التضادي على الوسطين PDA والآجار المائيWA.

3. النتائج

1.3 الكائنات البكتيرية التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *R. solani* المحدث لمــرض القشرة السوداءعلى البطاطا

أبدت بعض العزلات البكتيرية المعزولة من العينات الترابية تضاداً مع ***R. solani*** التابعة للمجموعة التشابكية AG3، في حين لم تبدِ عزلات أخرى تضاداً إزاء الممرض المستهدف. ويبين الجدول(21) العزلات التسع التي اتسمت بتأثير تضادي للفطر المدروس ومناطق أخذ العينة ونسب التضاد لكل منها.

جدول 21: **متوسط نسبة المنع للعزلات البكتيرية التي اتسمت بتأثير تضادي للفطر *R. solani* للمجموعة AG3 ومناطق أخذ العينة ونسب التضاد لكل منها.**

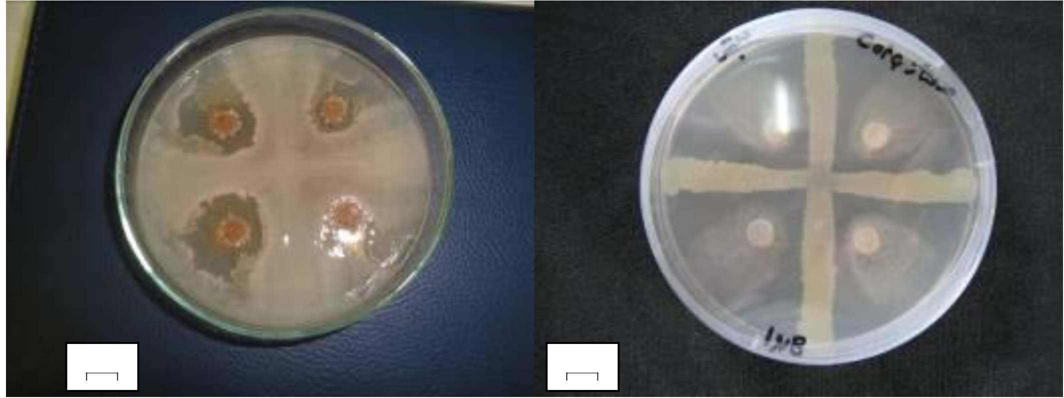
اسم العزلة	متوسط نسبة المنع %
كوكب Col- 4	**68.3a**
مرعناز Col- 4	**68.1ab**
السمرة Col- 1	**66.4abc**
كوكب Col- 2	**61.8abcd**
حوران جبارية Col- 3	**61.4abcde**
تلالين Col- 3	**61.2abcdef**
مرعناز Col- 5	**57.3defg**
حوران جبارية Col- 4	**56.4defgh**
فريرية Col- 1	**53.3defghi**
LSD= 7.484	CV%=12.1

الأرقام المتبوعة بأحرف متشابهة عمودياً لا يوجد بينها فروق معنوية

أمكن تحديد هوية 7 عزلات فقط من العزلات المذكورة وهي: السمرة col 1، جباريه col 4، جبارية col 3، فريرية col 1، مرعناز col 5، تلالين col 3، كوكب col 2. حيث استخدم جهاز BIOLOG لتحديد هوية البكتيريا التي اتسمت بالتضاد وذلك بعد تخطيطها على ثلاثة أوساط غذائية فظهرت البكتيريا على الوسطين Blood Agar Base و CLED Agar ولم تظهر أي من العزلات البكتيرية على الوسط EMB-Agar الخاص بالبكتيريا السالبة لغرام، وهذا دلالة على أن جميع العزلات تنتمي للبكتيريا الموجبة لغرام. كما وجد عند فحصها تحت المجهر بعد صبغها بصبغة الكريستال البنفسجي، أن جميعها كانت عصوية الشكل وذات لون بنفسجي. استخدمت الأطباق الخاصة بالبكتيريا الموجبة لغرام (MICRONAUT_ PRO short instructions) وبعد تحضير المعلقات وتحضينها ووضعها في الجهاز، أخذت النتائج التالية:

APPA- PYR+ D-ALA+ ASP- GLY+ PROL- LYS+ TYR- GLYT- a-GAL+ PNPG+ aCHIT- CHIT+ PGUR- a-MAN- _-FUCPNPX+ GLUF+ MATF+ RAFF- MALF+ SUCF+ LACF- TURF- ADHA

أي أن العزلات المختبرة أعطت تفاعلاً إيجابياً مع بعض الأنزيمات وتفاعلاً سلبياً مع إنزيمات أخرى، وتبين حسب قارئ الأطباق أن جميع العزلات انتمت للبكتيريا *Bacillus subtilis* بنسبة 99%.



الشكل 20: **التضاد البكتيري للمجموعة AG3 للفطر *R. solani*.**

2.3 الكائنات الفطرية التي تتسم بتأثير تضادي إزاء الفطر *R. solani* المحـــدث لمـــرض القشرة السوداء في البطاطا

عزل الفطر *Trichoderma* sp. من العينات الترابية التي تم جمعها خلال عملية المسح الحقلي، حيث تم مواجهة هذا الفطر المعروف بكونه فطراً تضادياً مع الممرض المدروس.

- تبين خلال تجربة تحت ظروف المختبر، وذلك بوضع قرص لكل من الفطر الممرض والفطر التضادي *Trichoderma* sp. على الطبق ذاته، أن كلاً من الفطرين نما باتجاه الأخر مع توقف نمو الفطر الممرض في حين استمر نمو *Trichoderma* sp. فوق الممرض مع تبوغ كثيف، كما ً أخذ قطر المستعمرة لكل من الفطرين مقارنة مع الشاهد.

جدول 22: **نتائج التأثير التضادي للفطر *Trichoderma* sp. في المجموعة AG3 لــ *R. solani* وقياس قطر المستعمرة لكلا الفطرين وكلاهما على طبق واحد:**

متوسط سرعة النمو لــ AG3&Trichoderma مم/ يوم (على الطبق ذاته)

المعاملة	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
الشاهدTrichoderma	30.3	71.6	85.0	85.0
الشاهدAG3	20.6	41.0	66.6	85.0
Trichoderma	28.8	53.0	57.6	85.0
AG3	21.5	32.0	32.0	32.0

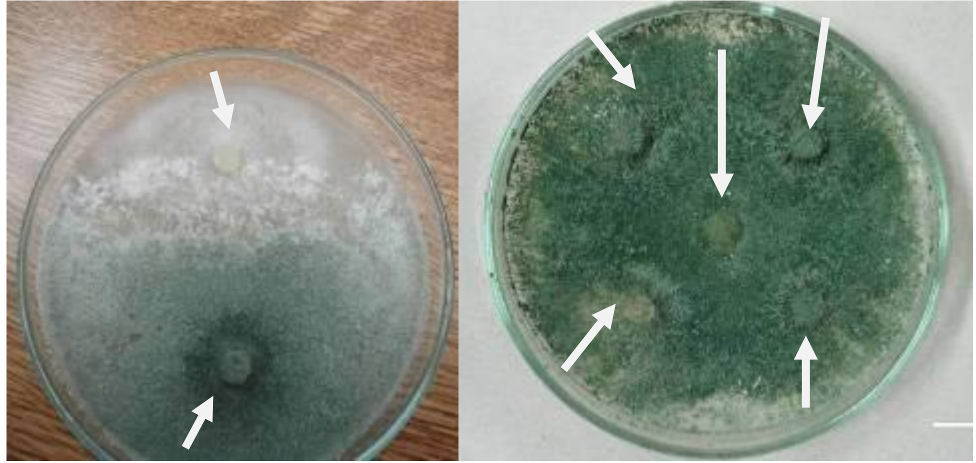
وفي تجربة أخرى، وضع الطبق الحاوي على الفطر الممرض فوق الطبق الحاوي على الفطر التضادي إلا أن AG3 استعمرت كامل الطبق خلال 4 أيام بوجود الفطر التضادي وعدم وجوده، وبالتالي لم يكن للفطر *Trichoderma* sp. ، بهذه الطريقة، تأثير في المجموعة AG3.

تباين متوسط سرعة النمو على وسطي PDA وWA، إذ بلغ متوسط سرعة النمو للفطر التضادي على الوسط PDA 22.6 مم/ يوم، في حين كان 10 مم/ يوم على وسط WA. وكانت نسبة التبوغ 100% بعد 7 أيام من زراعتها على وسط PDA، في حين كانت نسبة التبوغ 100% بعد11 يوماً من زراعتها على وسط WA.

جدول 23: **نتائج التأثير التضادي للفطر *Trichoderma* sp. في المجموعة AG3 لـ *R. solani* وقياس قطر المستعمرة لكلا الفطرين من خلال تطابق الأطباق**

متوسط سرعة النمو لـ AG3&Trichoderma مم/ يوم (تطابق الأطباق)

المعاملة	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع
الشاهد Trichoderma	28.2	76.0	85.0	85.0
الشاهد AG3	10.1	35.0	62.0	85.0
Trichoderma	24.1	73.6	85.0	85.0
AG3	10.8	35.0	61.0	85.0



الشكل 21: **تثبيط نمو المجموعة AG3 من قبل الفطر.*Trichoderma* sp مع التبوغ الكثيف.**

4 المناقشة

وجد أن جميع العزلات البكتيرية التي أبدت تضاداً مع المجموعة AG3 التابعة للفطر *R. solani* كانت من النوع *Bacillus subtilis*. وهناك دراسات عدة تؤكد دور هذه البكتيريا في مكافحة *R. solani* حيث أكد Papavizas (1985)، وYu (2002) دور .*Bacillus* spp في التأثير التضادي إزاء الفطر المدروس. أيضاً أشارت دراسات سابقة إلى دور *Bacillus subtilis* في مكافحة أمراض *R. solani* التي تصيب محاصيل معينة كفول الصويا (Liu & Sinclair, 1987)، والبطاطا والرز (Tschen, 1987)، والشوندر السكري (Moussa, 2002).

أكدت دراسات دور .*Trichoderma* spp المتسمة بتأثير تضادي إزاء الفطر *R. solani* (Yu, 2002; Papavizas, 1985). فقد كان للفطر .*Trichoderma* sp دور في إيقاف نمو المجموعة AG3 تحت ظروف المختبر وعلى الطبق نفسه، وأكدت دراسة أن استخدام الفطر *Trichoderma viride* أدى إلى انخفاض معنوي في نمو الفطر المستهدف مخبرياً وذلك بوضع قرص من كلا الفطرين على الطبق نفسه (Mohammed *et al.*, 2008). في حين لم يكن للفطر التضادي تأثير في الفطر *R. solani* التابع للمجموعة AG3، وقد يشير ذلك إلى أن المادة 6-pentyl-alpha-pyrone (6PAP) التي ينتجها الفطر التضادي لم تؤثر في الفطر الممرض المستهدف أو أن الفطر لم ينتجها. ولكن ليس من الضروري أن تكون هناك علاقة بين كفاءة الفطر التضادي تحت ظروف المختبر وظروف الدفيئة الزجاجية (Asran *et al.*, 2005). لذا يمكن الإعتماد على المكافحة الأحيائية كونها تؤمن طرائق بديلة وصديقة للبيئة وذلك باستخدام الكائنات المضادة لمكافحة أمراض النبات (Shahrokhi, 2005).

الفصل الخامس

المكافحة الكيميائية

1 الدراسة المرجعية

أشير إلى مدى واسع من مبيدات الفطور التي يمكن استخدامها في مكافحة المرض على البطاطا، ابتداءً من المبيدات واسعة الطيف (Dithiocarbamate, metham sodium) إلى المبيدات الانتخابية مثل (Phenyl urea pencycuron) (Jeger *et al*., 1996) على أن واحداً من المبيدات لم يكن فعالاً إزاء كافة أنواع الجنس *Rhizoctonia* (Kataria *et al*., 1991).

وجد Wicks ورفاقه (1995) أن كلاً من Fepiclonil والفورمالين وPencycuron والـ tolclofos-methyl خفضت حيوية الأجسام الحجرية للفطر *R. solani* على درنات البطاطا بشكل معنوي. كما وجد في دراسة أخرى أن المعاملة بـ Azoxystrobin تؤدي إلى زيادة معنوية في الغلة (Virgen-Calleros *et al*., 2000)، وأظهر بحث آخر حساسية عالية لمبيدات Flutolanil وIprodione وPencycuron (Campion *et al*., 2003). وبما أن اللقاح المعدي يمكن أن يكون محمولاً على الدرنات المعدّة للبذار (التقاوي)، فإن استعمال بذار مصاب أو الزراعة في تربة ملوثة قد يحدث خفضاً في محصول البطاطا القابل للتسويق (Platt *et al*., 1993). وعليه، فإن زراعة بذار خال من الإصابة أو معاملة الدرنات بمبيدات الفطور أو الكائنات المضادة يعدّ أمراً مفيداً. على أن المعاملة بمبيدات الفطور قد لا تؤمن مكافحة كاملة نظراً لوجود اللقاح المعدي في التربة.

1.1 معاملة الدرنات

في حال وجود الأجسام الحجرية على درنات البذار، يجب ألا تغطي أكثر من 5 % من سطح الدرنة. وقد توفر معاملة درنات البذار بالمبيدات الفطرية بعض الحماية من موت البراعم، وبخاصةٍ عندما تكون الدرنات المعدة للبذار مصابة. ولكن هذه المعاملة لن تكون نافعة إذا كانت التربة ملوثة بطاقة لقاحية عالية من الفطر (Cubeta *et al*., 1998).

طورت عديد من المبيدات خصيصاً لمكافحة الممرضات المحمولة على درنات البطاطا، وهي توفر مكافحة واسعة الطيف ضد كل من أمراض الرايزكتونيا، والقشرة الفضية، وعفن الفيوزاريوم الجاف والنقطة السوداء. وتتضمن هذه المبيدات: Tops MZ (thiophanate-methyl & mancozeb) وMaxim MZ (fludioxinil & mancozeb) (ومركبات Maxim الأخرى مع المانكوزيب)

و(Moncut MZ (flutolanil & mancozeb. تحسن معاملة الدرنات بهذه المنتجات انتصاب النبات وتنشيطه، ويمكن أن تؤخر الانبثاق، أحياناً، إذا ترافقت معاملة الدرنات مع الزراعة في تربة باردة ورطبة ولكن هذا التأخير عَرَضي ويعوض النبات نموه لاحقاً. والفائدة الإضافية للمعاملة (إذا تضمنت الصيغة المانكوزيب) هي القضاء على مسبب اللفحة المتأخرة المحمول على الدرنات (Wharton *et al.*, 2007).

2.1 المكافحة في الحقل

تشير نتائج بعض التجارب إلى أن تطبيق بعض المبيدات في الحقل عند الزراعة أدت إلى مكافحة أمراض *Rhizoctonia* على البطاطا بشكل ممتاز ومعنوي، وهذه المبيدات هي (Flutolanil) Moncut وQuadris (Azoxystrobin). ولكن كانت كل من معاملة الدرنات وتطبيق المبيدات في الحقل تخفق أحيانا في مكافحة المرض أو تعطي نتائج محدودة، وقد يعزى ذلك إلى مصادفة حدوث فترات طويلة تكون فيها التربة باردة ورطبة بعد الزراعة مباشرةً، أو إلى الزراعة في تربة تحوي طاقة لقاحية عالية من الممرض.

2 مواد العمل وطرائقه

تم دراسة تأثير المبيد الفطري المعروف تجارياً باسم ريزولكس (tolclofos methyl 50%) (من مجموعة الهيدروكربونات العطرية aromatic hydrocarbons) في نموات المجموعات التشابكية للفطر *R. solani*: (AG1، AG2-1، AG2- 2، AG3P، AG3، AG3R, AG4GHII، AG5، AG6، AG8، AG9، AG12، AG4GHI) والتي تم تنميتها على وسط PDA المسمم بالمبيد السابق باستخدام التراكيز (1.5 و3 و6 غ مستحضر تجاري/ ليتر بيئة (0.75، 1.5 و3غ مادة فعالة/ ليتر بيئة) ومقارنتها مع الشاهد علماً أن AG3R هي العزلة السورية التابعة للمجموعة AG3.

استخدمت أطباق بتري بقطر 9 سم حاوية على 20 مل من الوسط المسمم وبمعدل ثلاثة أطباق لكل معاملة بالإضافة إلى أطباق الشاهد الحاوية على وسط PDA فقط. كان عمر المستعمرة المأخوذ منها أقراص الفطر الممرض للمجموعات السابقة 7 أيام، حيث وضع قرص بقطر 5 مم من الفطر الممرض في وسط الطبق وحضنت عند 22± 2 ْس في الظلام. كما تم دراسة تأثير المبيد الفطري السابق وبالتراكيز ذاتها في الفطر *Trichoderma* sp. في أطباق حاوية 20 مل من الوسط المسمم، ووضع في مركز الطبق قرص من الفطر التضادي السابق بعمر 7 أيام وحضنت الأطباق عند 24± 2 ْس في الظلام مع الأخذ بعين الاعتبار وجود الشاهد وبمعدل أربعة مكررات.



الشكل 22: **مجانسة الوسط، وزراعة أقراص من المجموعات التشابكية AGs في وسط الطبق المسمم.**

3 النتائج

طبق المبيد Tolclofos methyl وبالتراكيز المذكورة (1.5، 3، 6 غ مستحضر تجاري/ لتر PDA) على المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* لمعرفة مدى تأثيره في النمو القطري للفطر *R. solani* ومدى التباين بين المجموعات التشابكية في رد فعلها إزاء المبيد المختبر، فوجد أن استخدام المبيد أدى إلى تشوه في ميسيليوم الفطر للمجموعتين التشابكيتين AG2-2، AG-3، فبدلاً من أن تكون سطحية أصبحت قطنية Fluffy عند جميع التراكيز المستخدمة، واختلفت المجموعات التشابكية في رد فعلها إزاء المبيد المستخدم. وتم أيضاً قياس سرعة النمو للمجموعات التشابكية دون إضافة المبيد كشاهد للتجربة.



الشكل 23: **تأثير المبيد tolclofos methyl في المجموعة AG2-2 وتحول شكل الميسيليوم إلى قطني.**

لم يسمح التركيز 6غ مستحضر تجاري/لترPDA بنمو المجموعات AG1، AG2-1، AG3، AG 3 R ، AG5، AG6، AG8، AG9، AG12، AG4HGI، AG4HGII. في حين نمت المجموعات AG2-2، AG3 P. أي اختلف تأثير المبيد حتى ضمن المجموعة الواحدة فالتركيز السابق لم يسمح بنمو AG3 في حين سمح بنمو AG3P.وأدى تطبيق التركيز 3 غ مستحضر تجاري /لتر إلى نتائج مماثلة ولكن نمت المجموعات بمعدل أعلى من التركيز السابق. كما أدى استخدام التركيز الأدنى للمبيد 1.5غ مستحضر تجاري /لتر إلى نتائج مقاربة للتركيز 3غ مستحضر تجاري /لتر ولكن ظهر نمو الفطر في اليوم الثاني في حين ظهر عند التركيز 3غ مستحضر تجاري / لتر في اليوم الثالث، وهذا موضح في الجدول(24)

جدول 24: **نتائج تأثير التراكيز الثلاثة للمبيد في نمو ميسيليوم المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* مم/يوم) بالإضافة لوجود الشاهد**

المجوعة التشابكية	متوسط سرعة النمو مم/ يوم				
	اليوم الأول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس
الشاهدAG1	41.4	77.0	85.0		
AG1 غ/ل6	0	0	0		
AG1 غ/ل3	0	0	0		
AG1 غ/ل1.5	0	0	0		
الشاهدAG2-1	21.0	39.0	74.0	85.0	
AG2-1 غ/ل6	0	0	0	0	
AG2-1 غ/ل3	0	0	0	0	
AG2-1 غ/ل1.5	0	0	0	0	
الشاهد **AG2-2**	23.0	5.0	85.0		
AG2-2 غ/ل6	0	0	7.0		
AG2-2 غ/ل3	0	0	11.0		
AG2-2 غ/ل1.5	0	10.0	10.0		
الشاهد **AG3 P**	24.0	54.0	85.0		
AG3 P غ/ل6	0	0	10.0		
AG3 P غ/ل3	0	0	11.0		
AG3 P غ/ل1.5	0	0.9	12.0		
الشاهد **AG3**	17.0	33.0	56.0	78.0	85.0
AG3 غ/ل6	0	0	0	0	0
AG3 غ/ل3	0	0	0	0	0
AG3 غ/ل1.5	0	0	0	0	0
الشاهد **AG3**R	16.0	35.0	73.0	84.0	85.0
AG3 syr غ/ل6	0	0	0	0	0
AG3 syr غ/ل3	0	0	0	0	0
AG3 syr غ/ل1.5	0	0	0	0	0
الشاهد **AG4HGII**	22.0	41.0	78.0	85.0	
AG4HGII غ/ل6	0	0	0	0	
AG4HGII غ/ل3	0	0	0	0	
AG4HGII غ/ل1.5	0	0	0	0	
الشاهد **AG5**	16.0	39.0	76.0	85.0	
AG5 غ/ل6	0	0	0	0	

AG5 3غ/ل	0	0	0	0	
AG5 1.5غ/ل	0	0	0	0	
الشاهد **AG6**	21.0	44.0	75.0	85.0	
AG6 6غ/ل	0	0	0	0	
AG6 3غ/ل	0	0	0	0	
AG6 1.5غ/ل	0	0	0	0	
الشاهد **AG8**	15.0	37.0	73.0	85.0	
AG8 6غ/ل	0	0	0	0	
AG8 3غ/ل	0	0	0	0	
AG8 1.5غ/ل	0	0	0	0	
الشاهد **AG9**	20.0	38.0	71.0	78.0	85.0
AG9 6غ/ل	0	0	0	0	0
AG9 3غ/ل	0	0	0	0	0
AG9 1.5غ/ل	0	0	0	0	0
الشاهد **AG12**	18.0	35.0	65.0	78.0	85.0
AG12 6غ/ل	0	0	0	0	0
AG12 3غ/ل	0	0	0	0	0
AG12 1.5غ/ل	0	0	0	0	0
الشاهد **AG4HGI**	20.0	42.0	71.0	79.0	85.0
AG4HGI 6غ/ل	0	0	0	0	0
AG4HGI 3غ/ل	0	0	0	0	0
AG4HGI 1.5غ/ل	0	0	0	0	0

ولم تسمح التراكيز الثلاثة من المبيد Tolclofos methyl بنمو المجموعة AG3.

درس تأثير المبيد الفطري السابق أيضاً، وبالتراكيز الآنفة الذكر في الفطر *Trichoderma* sp. حيث أدى استخدام المبيد أيضاً إلى تشوه في طبيعة نمو ميسيليوم الفطر فبدلاً من أن تكون مستعمراته ذات حواف مستديرة أصبحت متعرجة ومقسمة إلى قطاعات sectoring، وتأخر تشكل الأبواغ مقارنة مع الشاهد. ففي معاملة الشاهد غير الحاوية على المبيد السابق، اكتمل نمو الفطر على الطبق خلال 3 أيام مع تبوغه الكامل على سطح الطبق خلال 5 أيام، في حين لم تكن الأطباق المسممة وبالتراكيز الثلاثة مشكلة للأبواغ مقارنة مع الشاهد الذي كانت نسبة التبوغ فيه 100%. كما هو موضح في الجدول (25)

جدول 25: **نتائج تأثير المبيد tolclofos methyl في قطر نمو ميسيليوم الفطر التضادي *Trichoderma* sp بالميليمتر.**

التراكيز	متوسط سرعة النمو لـ Trichoderma × Rizolex مم/يوم		
	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث
0 غ	**28.3**	**75.5**	**85.0**
6 غ	**6.3**	**10.7**	**25.6**
3غ	**6.125**	**9.5**	**21.75**
1.5 غ	**4.375**	**9.0**	**16.125**

ولوحظ أن تأثير المبيد عند التركيز 1.5غ مستحضر تجاري/ل في الفطر التضادي كان أكبر من تأثير التركيزين 6 و3غ مستحضر تجاري/ل. أعيدت التجربة مرة أخرى وكان التركيز 1.5غ مستحضر تجاري / ل أيضاً هو التركيز الأكثر تأثيراً في الفطر التضادي.



الشكل 24: **تأثير المبيد tolclofos methyl في الفطر *Trichoderma* sp.**

أ: نمو ميسيليوم *Trichoderma* sp. دون إضافة مبيد   ب: نمو ميسيليوم *Trichoderma* sp. بعد إضافة المبيد.

4 المناقشة

لم تسمح التراكيز الثلاثة المستخدمة من المبيد Tolclofos methyl بنمو المجموعة AG3.وهذا يؤيد الدراسة التي أثبتت أن المبيدين Pencycuron وTolclofos methyl فقط يثبطا نمو AG3 بنسبة 100% تحت ظروف المختبر (Carling *et al.*, 2000). واختلفت المجموعات التشابكية في حساسيتها تجاه المبيد المستخدم، واختلفت الحساسية حتى ضمن المجموعة الواحدة، إذ لم تسمح التراكيز الثلاثة بنمو المجموعة AG2-1، وسمحت بنمو المجموعة AG2-2. وتأتي هذه النتائج مؤيدة لنتائج باحثين آخرين سجلوا تنوّعاً في الحساسية لمبيدات الفطور ضمن المجموعات التشابكية لدى الفطر *R. solani* وحتى ضمن المجموعة ذاتها (Ueyama *et al.*, 1990; Kataria *et al.*, 1991; Csinos & Stephenson, 1999; Sumner, 1987; Martin *et al.*, 1984; Virgen-Calleros *et al.*, 2000; Campion *et al.*, 2003).

وأشارت إحدى الدراسات إلى أن الحساسية لمبيدات الفطور يمكن أن تتنوع ضمن العزلات التابعة للـــمجموعة التشابكية AG ذاتها (Ueyama *et al.*, 1990). وتبين في هذا البحث أن التراكيز الثلاثة من المبيد لم تسمح بنمو العزلتين AG3، AG3 R، في حين سمحت بنمو العزلة AG3P رغم أن هذه العزلات الثلاث تنتمي لمجموعة تشابكية واحدة. وعند دراسة تأثير المبيد وبالتراكيز الثلاثة السابقة

الذكر في الفطر التضادي *Trichoderma* sp، وجد أن التركيز الأدنى وهو 1.5 غ/ل ، كان أكثر تأثيراً من التركيزين السابقين وبالتالي يمكن استخدام هذا الفطر في المكافحة الأحيائية بالإضافة للمكافحة الكيميائية معاً

الفصل السادس

الإسهام في وضع خطة متكاملة لمكافحة المرض باستخدام الكائنات المضادة (مكافحة أحيائية) والمبيدات الكيميائية للفطور (مكافحة كيميائية)

1 الدراسة المرجعية

تتطلب إدارة المرض الذي يحدثه فطر *Rhizoctonia* مكافحة متكاملة ومعرفة جيدة بكل مرحلة من مراحل المرض (Cubeta *et al.*, 1998). ورغم أنه لا يمكن القضاء على الأمراض التي يحدثها الرايزوكتونيا بشكل كامل حالياً، ولكن من شأن تطبيق مجموعة من المعاملات الزراعية وإجراءات الوقاية أن تحد من شدة الإصابة. ورغم أن معظم إجراءات المكافحة المتكاملة تعتمد على المعاملات الزراعية، إلا أن ذلك لا يمنع من استخدام المكافحة الكيميائية أيضاً (Wharton *et al.*, 2007).

أهم المعاملات الزراعية للحد من هذا المرض هي:

- زراعة تقاوي خالية من الأجسام الحجرية بموجب شهادة منشأ نظامية، إذ يجب تغيير مصدر البذار عند وجود أكثر من 20 جسم حجري مرئي على أحد جوانب الدرنة بعد غسلها. ذلك أن اللقاح المحمول على الدرنات أهم من اللقاح القاطن في التربة كمسبب أولي للمرض. وعلى منتجي البذار (حقول الإكثار) زراعة تقاوي خالية نهائياً من الأجسام الحجرية (Cubeta *et al.*, 1998; Wharton *et al.*, 2007).
- يقلل إتباع كل الإجراءات التي تسرّع من انبثاق السوق والمدادات في الربيع من احتمال الإصابة (Wharton *et al.*, 2007) كالزراعة في الترب ذات القوام الخشن لأن محتواها من الماء يكون أقل نسبياً، الأمر الذي يسرع بدء تطور النبات (Wharton *et al.*, 2007)؛ والزراعة على عمق قليل (5−7.5 سم)؛ وتغطية الدرنات بأقل قدر ممكن من التربة؛ والزراعة في الترب ذات درجات الحرارة فوق 8−15 ْس (Cubeta *et al.*, 1998; Wharton *et al.*, 2007)، الأمر الذي يسرّع تطور السوق والمدادات والانبثاق ويقلل من احتمال الإصابة بتقرّح الساق (Wharton *et al.*, 2007).
- لا يستطيع الفطر *Rhizoctonia* منافسة الكائنات الدقيقة الأخرى في التربة بشكل جيد. حيث تقلل زيادة معدل تحلل بقايا المحصول (Wharton *et al.*, 2007; Johnson & Leach, 2008)، وكمية المادة العضوية (Johnson & Leach, 2008) في التربة من معدل نمو الفطر.. وتُطلِق عملية تحلل بقايا المحصول غاز CO_2 في التربة أيضاً، الأمر الذي يقلل من قدرة الممرض التنافسية.

ولا يستطيع الفطر تحليل السيلليلوز بشكل كاف، وهكذا ينخفض لقاح الفطر في التربة بفعل منافسة ميكروفلورا التربة (Wharton *et al*., 2007; Johnson & Leach, 2008) وكلما انخفض محتوى التربة من المادة العضوية تزداد قدرة الفطر *Rhizoctonia* التنافسية وكذلك خطورته (Johnson & Leach, 2008)، كما تنخفض نسبة الإصابة بالمرض (Wharton *et al*., 2007). فزراعة البطاطا في تربة فقيرة بالمادةالعضوية وذات طاقة لقاحية عالية بالفطر *Rhizoctonia* تشجع نمو الأخير وتزيد من حدوث المرض (Johnson & Leach, 2008).

- يجب الإسراع في قلع البطاطا فور تصلب قشرة درناتها (Wharton *et al*., 2007; Johnson & Leach, 2008)، لتقليل حدوث الخدوش عليها (Johnson & Leach, 2008). وكلما طالت الفترة مابين حش المجموع الخضري والقلع يزداد تشكل الأجسام الحجرية على الدرنات، وتزداد نسب الدرنات المصابة بالأجسام الحجرية.
- يقلل إزالة البقايا النباتية أو حرقها أيضاً من كمية اللقاح المتاح لإعداء الدرنات التي ستزرع فيما بعد، ويجب تجنب إلقاء الدرنات المصابة في الحقول التي ستزرع بالبطاطا لاحقاً لأنها يمكن أن تكون مصدراً للقاح (Wharton *et al*., 2007; Johnson & Leach, 2008).

يقلل استخدام الحراثة بالمحراث الحفار (Chisel plowing) أيضاً من حدوث المرض وشدته (Johnson & Leach, 2008). ورغم أن الفطر *Rhizoctonia* يهاجم البطاطا بشكل أساسي إلا أنه يمكن أن يثابر في التربة لعدة سنوات. لذلك يشجع المزارعون على الزراعة في الأراضي التي لم تزرع فيها البطاطا من قبل، وتطبيق دورة زراعية ثنائية أو ثلاثية بدون البطاطا (Cubeta *et al.,* 1998; Johnson & Leach, 2008)، وتكمن أهمية الدورة الزراعية ليس فقط في مكافحة المرض، بل والقضاء أيضاً على الأعشاب و تحسين خصوبة التربة (Leach & Clapham, 1992; Wessels, 2001). وقد وجد من دراسة تأثير الدورة الزراعية في مكافحة الفطر *Rhizoctonia*، نجاة العزلات ثنائية النوى من الفطر *Rhizoctonia* بشكل كبير وملحوظ مقارنة بالعزلات متعددة النوى، وأن المجموعات التشابكية للفطر *Rhizoctonia* ثنائية النوى تحمي المحاصيل من المجموعات التشابكية للفطر *Rhizoctonia* متعددة النوى. فالمجموعة التشابكية AG-G وهي ثنائية النوى تحمي محصول البطاطا من المجموعة AG3 (Cubeta *et al*., 1991).

أشار Anon (2001) وRasochova (1983) الى أن الصنفين "Jaerla" و"Ausonia" يمتلكان مقاومة ضعيفة ومتوسطة للفطر *R. solani*، على أن دراسةً حديثةً أجريت في تركيا (Yanar *etal*., 2005) أظهرت أن كلا الصنفين شديدا القابلية للإصابة بتقرّح الساق. ولا بدّ من التركيز على هذه الناحية مستقبلاً. لا توجد حتى الآن أصناف منيعة لمرحلة إخفاق إعطاء البراعم وإصابة الساق (Cubeta *et*

al., 1996; Jeger *et al.*, 1996; Johnson & Leach, 2008). في حين أظهرت بعض الأصناف درجات متفاوتة من المقاومة لتشكيل الأجسام الحجرية على الدرنات (Johnson & Leach, 2008)

2 مواد العمل وطرائقه

1.2 تحضير اللقاح: Inoculum preparation

حملت المجموعات التشابكية للفطر الممرض *R. solani* والفطر *Trichoderma* sp. على الذرة البيضاء (السورغمية)، وتم ذلك بعد غسل حبوب الذرة جيداً بماء الصنبور ونقعها حتى اليوم التالي، ثم سلقت الحبوب ووضعت بمعدل 50 غ لكل دورق، وعقمت بالحرارة الرطبة لمدة ساعة ونصف عند 121 ْس في الأوتوكلاف. ثم نقلت الدوارق ووضعت في غرفة العزل حتى تبرد، وتم تلقيحها بالمجموعات التشابكية للفطر الممرض وللفطر *Trichoderma* sp.، كل على حدا، بمعدل 5 أقراص لكل دورق، مأخوذة من مستعمرات بعمر 7 أيام، وضعت الدوارق في غرفة النمو عند 22± 2 ْس في الظلام. تم هز الدوارق دورياً، وبعد تغطية ميسليوم الفطور النامية لكامل سطح الحبوب في الدوارق حفظت عند 4 ْس لحين استخدامها.



الشكل 25: **تحضير البيئة الحبية الحاملة للفطر *R. solani* (أو تحضير لقاح العدوى)**

2.2 إعداء التربة باللقاح

استخدمت أصص ذات سعة 1 كغ (تعادل 1,5 لتر بيتموس)، وملئت الأصص بمعدل 500 غ من البيتموس لكل أصيص بحيث حفظت الكمية الباقية لحين استخدامها في عملية التحضين. لقح كل أصيص بمعدل 100 مل من معلق ميسليوم الفطر– الممرض– المتجانس (1 غ ذرة سورغمية ملقحة بالفطر/1كغ بيتموس) (Kasem *et al.*, 2010)، وتتراوح نسبة استخدام اللقاح المحمول على البذور من 0.01 إلى 4 % (حجم/حجم، وزن/حجم)، أو أقراص من الآجار وذلك قبل الزراعة (MacNish *et*

(*al*., 1995) ووضعت هذه الأصص في ظروف الدفيئة الزجاجية عند 19± 2 ْس لمدة 4 أيام قبل عملية الزراعة.

استخدمت أصص ذات سعة 1 كغ من البيتموس (تعادل 1,5 لتر)، ملئت الأصص بمعدل 500 غ من البيتموس لكل أصيص بحيث حفظت الكمية الباقية لحين استخدامها في عملية التحضين. لقح كل أصيص بمعدل 100 مل من المعلق البوغي المتجانس للفطر *Trichoderm* sp. بتركيز 5×10^{6} بوغة/مل، (أخذ 1غ من حبوب الذرة البيضاء الملقحة بفطر *Trichoderma* sp. ووضعت في دورق يحوي 120 مل من الماء المقطر، وتم تحريكها لمدة 5 دقائق على المحرك، ثم أخذ 1 مل من المعلق ووضع في أنبوب على جهاز (vortex) لمدة 30 ثا وأخذ من هذا المعلق 100 ميكرولتر لحساب تركيز الفطر في المعلق، للحصول على التركيز 5×10^{6} بوغة/مل) ووضعت جميع الأصص ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية في مجال يتراوح 22± 2 ْس.



الشكل 26: **عملية الإعداد والزراعة ووضع كل معاملة في صواني خاصة بها.**

استخدمت درنات متماثلة الحجم تقريباً تتراوح أوزانها بين 25 –30 غ من الصنف القابل للإصابة (بينيلا). تم إضاقة الكمية المتبقية من البتموس أثناء التحضين بعد ظهور 3–4 أوراق حقيقية. وتضمنت تجربة الدفيئة الزجاجية ثماني معاملات:

- **المعاملة الأولى (القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية):**

وتضمنت 39 أصيصاً بمعدل 3 مكررات لكل مجموعة تشابكية للفطر *R. solani* لمعرفة القدرة الإمراضية لهذه المجموعات على البطاطا. وذلك بزراعة درنات من الصنف بينيلا في أصص حاوية على بتموس معدي باللقاح المحمول على حبوب الذرة البيضاء، الخاص بكل مجموعة تشابكية كلٍ على حدا بمعدل درنة واحدة/ أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً.

- **المعاملة الثانية (الشاهد):**

وتضمنت 3 أصص حاوية على بتموس مزروع بالصنف القابل للإصابة (بينيلا) دون وجود الممرض بمعدل درنة واحدة/ أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً.

- **المعاملة الثالثة (المكافحة الكيميائية باستخدام المبيد Tolclofos- methyl (ريزولكس):**

استخدمت ثلاثة تراكيز من المبيد التجاري ريزولكس بمعدل (1.5 و3 و6غ مستحضر تجاري/1كغ بيتموس) على المجموعة التشابكية AG3، حيث تم سقاية كل أصيص بمعدل 50 مل لكل من التراكيز السابقة وبمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز في أصص حاوية على بتموس معدي بالمجموعة التشابكية AG3 ومزروعة بدرنات الصنف بينيلا بمعدل درنة واحدة/أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً.

- **المعاملة الرابعة (المكافحة الأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp.):**

استخدم بتموس معدي بكلٍ من الفطر الممرض من المجموعة التشابكية AG3 والفطر التضادي ***Trichoderma* sp.** وبتركيز 5×10^6 بوغة/مل لمعرفة تأثيره التضادي في نمو الفطر الممرض ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية. بحيث أخذت كميتان متساويتان من البتموس المعدي بالمجموعة التشابكية AG3 والبتموس المعدي بالفطر التضادي، وخلطت كميتا البتموس بشكل جيد، ثم زرعت بدرنات الصنف بينيلا بمعدل درنة واحدة / أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً.

.



الشكل 27: **إعداء البتموس بالفطر *Trichoderma* sp. وبالتركيز المطلوب مع الحفاظ على مجانسة التركيز**

- **المعاملة الخامسة (المكافحة الكيميائية والأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp.)**

طبقت المكافحة الكيميائية باستخدام المبيد tolclofos methyl وبتركيز 3غ مستحضر تجاري/اكغ بتموس بالإضافة إلى المكافحة الأحيائية باستخدام الفطر *Trichoderma* sp. وبتركيز 5×10^{6} بوغة/مل إزاء المجموعة التشابكية AG3 وذلك بزراعة درنات الصنف بينيلا في بتموس معدي بالفطر التضادي وبالتركيز سابق الذكر وسقاية الأصص بعد زراعتها بالمبيد المذكور بحجم 50 مل لكل أصيص. زرعت الدرنات بمعدل درنة واحدة / أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً، وكررت المعاملة ثلاث مرات.

- **المعاملة السادسة (المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis*):**

استخدمت أصص حاوية على بتموس معدي بالفطر الممرض من المجموعة AG3 وبعد 4 أيام من إعداء البتموس، زرعت درنات الصنف بينيلا بمعدل درنة واحدة / أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً، وكررت المعاملة ثلاث مرات، وتم سقاية الأصص بمعدل 50 مل من المعلق البكتيري بتركيز 2.36×10^{7} cfu/ml لمعرفة تأثيره التضادي في نمو الفطر الممرض ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية.

- **المعاملة السابعة (المكافحة الأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp& *Bacillus subtilis*)**

خُلطت كميتان متساويتان من البتموس المعدي بكل من الفطر الممرض والفطر التضادي، وبعد زراعة الدرنات تم سقاية الأصص بالمعلق البكتيري وبالتركيز سابق الذكر، ثم زرعت الدرنات بمعدل درنة واحدة / أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً، وكررت المعاملة ثلاث مرات.

- **المعاملة الثامنة قابلية إصابة بعض أصناف البطاطا بالفطر الممرض:**

لاختبار قابلية بعض الأصناف الهامة للإصابة بالمجموعة التشابكية AG3 للفطر *R. solani*، تم اختيار 3 أصناف من البطاطا هي بينيلا وسبونتا ودراجا. يتميز الصنف دراجا بفترة نمو تصل إلى 120 يوماً وهو من الأصناف المتأخرة، أما الصنف بينيلا فتصل فترة نموه إلى 90 يوماً وهو من الأصناف المبكرة، أما الصنف سبونتا فيصل متوسط فترة نموه إلى 110 أيام.

استخدمت أصص حاوية على بتموس معدي بالفطر الممرض من المجموعة AG3 وبعد 4 أيام من إعداء البتموس، زرعت درنات البطاطا بمعدل درنة واحدة / أصيص، واعتبر كل أصيص مكرراً، وكررت المعاملة ثلاث مرات. بعد ظهور الأوراق الحقيقية للبادرات استخدم السماد الذواب عالي الأزوت (N:P:K 30:10:10) بمعدل 1غ /1 لتر وسقي كل أصيص بمعدل 100 مل من السماد المذكور وذلك لكل المعاملات المذكورة سابقاً، وأعيدت عملية التسميد بالسماد المذكور ذاته بعد مرور 7 أيام من المعاملة الأولى. وبعد مرور أسبوع من هذه المعاملة، تم سقاية كافة المعاملات بالسماد الذواب عالي الفوسفور (N:P:K 10:30:10) وبالمعدل المذكور أعلاه ذاته

3 النتائج

- **المعاملة الأولى (القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية AGs ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية):**

اختبرت القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية AGs تحت ظروف الدفيئة الزجاجية وهي الظروف الأقرب للظروف الحقلية. ووجد أن جميعها كانت ممرضة للبطاطا. وتباينت المجموعات التشابكية في مكان إحداثها للإصابة على البطاطا، كما اختلفت الأعراض التي أحدثتها هذه المجموعات، فهناك مجموعة أحدثت إصابة على الجذر فقط مثل AG8، ومجموعات أحدثت إصابة على الجذر والمدادات كالمجموعتين AG9 و AG12، في حين أحدثت المجموعتين AG5 وAG6 إصابة للتاج والجذر، أما المجموعتين AG1، AG4HGI فقد أحدثتا إصابة على التاج والمدادات والجذر، أما المجموعتين AG2-2 وAG4HGII فأحدثتا، بالإضافة لتقرح التاج والمدادات والجذر،

تلونات بنية على سطح الدرنات وسببتا تشقق نسيج الدرنات بالإضافة إلى إحداثهما أعراضاً شبيهة بأعراض الجرب. وعند أخذ جزء من نسيج الدرنة المتلون باللون البني، بالإضافة إلى المنطقة الشبيهة بالجرب، لمعرفة إن كان السبب هو المجموعتين AG2-2 وAG4HGII أو مسبب آخر (كالجرب المتسبب عن *Streptomyces reticuliscabiei* ، تبين نتيجة العزل أن المسبب هو الفطر *R. solani* التابع للمجوعتين المذكورتين، أما المجموعة AG2-1 فأحدثت تقرح التاج والمدادات والجذور وتلونات بنية على الدرنات، كما شكلت الأجسام الحجرية على الدرنات الناتجة، وكانت بالكاد مرئية. أما العزلات التابعة للمجموعة الواحدة AG3، AG3 P،AG3 R فبالإضافة لإصابتها للتاج والمدادات والجذر، أحدثت مرض القشرة السوداء على التاج والمدادات والجذر بالإضافة على الدرنات الناتجة وبشكل واضح، ولوحظ أن **نسبة الأجسام الحجرية** على الدرنات التي شكلتها AG3P كانت أقل من تلك التي شكلتها AG3 وAG3R ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية، علماً أن AG3P هي تحت المجموعة المتخصصة على البطاطا. أي أن نسبة تغطية الدرنات بالأجسام الحجرية اختلفت حتى ضمن المجموعة الواحدة.



الشكل 28: **الأعراض التي أحدثتها المجموعة AG4GHI على التاج والمجموعة AG2-2 على الدرنات الناتجة مقارنة مع الشاهد، تحت ظروف الدفيئة الزجاجية.**





الشكل 29: **الأعراض التي أحدثتها المجموعة AG3 من تقرحات ومرض القشرة السوداء على الدرنات الناتجة تحت ظروف الدفيئة الزجاجية.**

تم أخذ وزن وعدد الدرنات الناتجة من كل معاملة معداة بمجموعة تشابكية منفردة.

جدول 26:**نتائج القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية تحت ظروف الدفيئة الزجاجية على الصنف بنيلا**

المجموعة التشابكية	التفاعل مع الصنف القابل للإصابة (بينيلا)
AG1	تقرحات واضحة على التاج +المدادات+ إصابة الجذر
AG2-1	التاج +المدادات + الجذر+ تلونات بنية والقشرة السوداءعلى الدرنات بالكاد ظاهرة.
AG2-2	اختزال المنطقة التاجية + المدادات + الجذر+تشوه للدرنات (تشققات) وتلونات بنية على الدرنات.
AG3 potato	التاج +المدادات + الجذر+ القشرة السوداءعلى التاج والمدادات والجذر والدرنات.
AG3	التاج +المدادات + الجذر + القشرة السوداء على التاج والمدادات والجذر والدرنات.
AG4HGII	التاج + الجذر+ تلونات بنية وتشقق نسيج الدرنة.
AG5	التاج + الجذر
AG6	التاج + الجذر
AG8	الجذر
AG9	المدادات+ الجذر
AG12	المدادات+ الجذر
AG4HGI	التاج +المدادات + الجذر
AG3 R	التاج + الجذر +المدادات +القشرة السوداء على التاج والمدادات والجذر والدرنات.

وزن الدرنات:

أظهرت نتائج القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية وجود تباين كبير في وزن درنات الصنف القابل للإصابة Benella المختبر إزاء كافة المجموعات التشابكية AGs المختبرة للفطر *R. solani* (AG1، AG2-1، AG2-2، AG3، AG3 potato، AG4HGI، AG4HGII، AG5، AG6، AG8، AG9، AG12، AG3 R)، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق عالية المعنوية (F pr.<

0.001) في وزن الدرنات تبعاً للمجموعة التشابكية المختبرة. حيث بلغ متوسط وزن الدرنات في معاملة المجموعة AG3 2.25 غ، وبلغ 78.51غ في معاملة الشاهد التي لم تعامل بأي من المجموعات التشابكية للفطر *R. solani*. وتراوح وزن الدرنات لباقي معاملات المجموعات التشابكية ضمن المجال 9.14 – 60.63 غ، وسببت معظم المجموعات انخفاضاً معنوياً في وزن الدرنات بالمقارنة مع معاملة الشاهد، بينما كان هذا الانخفاض ظاهرياً وبفرق غير معنوي لدى مجموعة تشابكية وحيدة هي المجموعة AG4HGII. أما المجموعات الأكثر تأثيراً في تخفيض وزن الدرنات فكانت عزلات المجموعة AG3: AG3، AG3 p، وAG3 R على الترتيب.

ورغم أن الإعداء بالمجموعة AG4HGII لم يحدث خفضاً في وزن الدرنات، إلا أن المجموعة AG4HGI كانت المجموعة الثالثة، من حيث الترتيب، في خفض وزن الدرنات، وأكدت هذه التجربة وتحت ظروف الدفيئة الزجاجية اختلاف العزلات المنتمية للمجموعة التشابكية الواحدة في تأثيرها في وزن الدرنات.

عدد الدرنات:

أظهرت نتائج القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية وجود تباين كبير في عدد درنات الصنف Benella القابل للإصابة المختبر إزاء كافة المجموعات التشابكية AGs المختبرة للفطر *R. solani* (AG1، AG2-1، AG2-2، AG3، AG3 p، AG4HGI، AG4HGII، AG5، AG6، AG8، AG9، AG12، AG3 R)، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق عالية المعنوية (F pr. < 0.001) في عدد الدرنات تبعاً للمجموعة التشابكية المختبرة. حيث بلغ عدد الدرنات عند المعاملة بالمجموعةAG2-2 8 درنات و1.97 درنة عند المعاملة بالمجموعة AG1. وتراوح عدد الدرنات عند المعاملة بباقي المجموعات التشابكية ضمن المجال 2 – 7.86 درنة. ولم تكن هناك فروق معنوية في عدد الدرنات بين معاملة الشاهد وكل من معاملات المجموعات: AG2-2، AG6، AG4GHII، AG9، AG4HI. بينما سببت باقي المجموعات التشابكية AG12، AG2-1، AG8، AG3 p، AG3، AG5، AG3 R، AG1 انخفاضاً معنوياً في عدد الدرنات بالمقارنة مع الشاهد.

جدول 27: **متوسط وزن الدرنات (غ) وعدد الدرنات (درنة). للنباتات المعداة بالمجموعات التشابكية ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

المجموعة التشابكية	متوسط وزن الدرنات غ	المجموعة التشابكية AGs.	متوسط عدد الدرنات
ctrl. O.	*78.5116^{a}	AG2-2	*8.00114^{a}
AG4HGII	60.6318^{ab}	AG6	7.86488^{ab}
AG6	55.013^{bc}	AG4HGII	6.99809^{abc}
AG9	43.5797^{bcd}	AG9	6.91999^{abcd}
AG12	40.4661^{bcde}	ctrl. O.	5.84528^{abcde}
AG2-1	39.545^{cdef}	AG4HGI	5.63868^{abdef}
AG2-2	39.4311^{cdefg}	AG12	4.85252^{cdefg}
AG8	23.3426^{defgh}	AG2-1	3.9991^{efgh}
AG1	22.0627^{defghi}	AG8	2.9987^{ghi}
AG4HGI	17.227^{hij}	AG3 potato	2.32537^{hij}
AG5	14.8313^{hijk}	AG3	2.27157^{hijk}
AG3 R	11.4783^{hijkl}	AG5	2.27157^{hijkl}
AG3 P	9.14256^{hijklm}	SYR isolate	2.00052^{hijklm}
AG3	2.24616^{hijklmn}	AG1	1.97292^{hijklmn}
	C.V.= 9.9%،$L.S.D._{0.05}$=21.94		**C.V.=3.6 %،$L.S.D._{0.05}$= 2.433**

* **المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها**

تباينت نتائج القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية تحت ظروف المختبر عن مثيلاتها في ظروف الدفيئة الزجاجية، في مكان الإصابة على نبات البطاطا، وهذا مبين في الجدول (28)

جدول 28: مقارنة الأعراض التي سببتها المجموعات التشابكية للفطر *R. solani* ضمن ظروف المختبر وظروف الدفيئة الزجاجية

		القدرة الإمراضية لـــــ AGs مخبرياً وحقلياً
AG1	مخبرياً	نكرزات على الساق، تقرح التاج، مهاجمة المدادات، تحلل الجذور،ذبول النبات.
	الدفيئة الزجاجية	تقرحات واضحة على التاج + تقرح المدادات+ إصابة الجذر
AG2-1	مخبرياً	تقرح التاج +تقرح المدادات وتحللها+ تحلل الجذور.
	الدفيئة الزجاجية	التاج + تقرح المدادات+ إصابة الجذر+ تلونات بنية والقشرة السوداءعلى الدرنات بالكاد ظاهرة.
AG2-2	مخبرياً	نكرزات على الساق+ تقرح التاج +تقرح المدادات وتحللها+ تحلل الجذور.
	الدفيئة الزجاجية	اختزال المنطقة التاجية + تفرح المدادات + الجذر+ تشوه للدرنات (تشققات) وتلونات بنية على الدرنات.
AG3 P	مخبرياً	تقرح كامل التاج+ مهاجمة المدادات+ تحلل الجذور.
	الدفيئة الزجاجية	التاج +المدادات + الجذر+ القشرة السوداءعلى التاج والمدادات والجذر والدرنات.
AG3	مخبرياً	نكرزات على الساق+تقرح التاج + تقرح الجذور.
	الدفيئة الزجاجية	التاج +المدادات + الجذر+ القشرة السوداءعلى التاج والمدادات والجذر والدرنات.
AG4HGII	مخبرياً	نكرزة التاج+ مهاجمة المدادات+ تحلل الجذور.
	الدفيئة الزجاجية	التاج + الجذر+ تلونات بنية وتشقق نسيج الدرنة.
AG5	مخبرياً	تقرح كامل التاج +تقرح التاج+ تقرح الجذور
	الدفيئة الزجاجية	التاج + الجذر
AG6	مخبرياً	تقرح التاج + تقرح المدادات+ تحلل الجذور
	الدفيئة الزجاجية	التاج + الجذر
AG8	مخبرياً	نكرزات خفيفة على الساق + تقرح التاج+مهاجمة الجذور
	الدفيئة الزجاجية	الجذر
	مخبرياً	تقرح التاج + مهاجمة المدادات + تحلل الجذور+ نكرزة الدرنات.
AG9	الدفيئة الزجاجية	المدادات + الجذر.
AG12	مخبرياً	تقرح التاج + مهاجمة الجذور.
	الدفيئة الزجاجية	المدادات + الجذر.
AG4HGI	مخبرياً	نكرزة الساق + نكرزة المنطقة التاجية + مهاجمة المدادات + مهاجمة الجذور
	الدفيئة الزجاجية	التاج + المدادات + الجذر
AG3 R	مخبرياً	تقرح كامل التاج + تحلل الجذور
	الدفيئة الزجاجية	التاج +المدادات + الجذر+ القشرة السوداء على التاج والمدادات والجذر والدرنات.

المعاملة الثانية (الشاهد):

أخذ وزن وعدد درنات معاملة الشاهد الحاوي على بتموس فقط دون وجود الممرض المدروس، لكل مكرر. وهذا مبين في الجدول (29)

جدول 29: **وزن الدرنات (غ) وعدد الدرنات (درنة). لمعاملة الشاهد ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

المكررات	عدد الدرنات	وزن الدرنات(غ)
1	8	78.3
2	7	64
3	5	96.3

المعاملة الثالثة المكافحة الكيميائية (Chemical control):

طبقت المكافحة الكيميائية على الصنف القابل للإصابة (بنيلا) المعدى بالمجموعة التشابكية AG3 وهي المجموعة المعنية وذلك لكل من الـــ (AG3، AG3 P، AG3 R). وبثلاثة تراكيز 1.5 و3 و6 غ مستحضر تجاري/ كغ بتموس المبيد المستخدم tolclofos methyl.

منع تطبيق المبيد tolclofos methyl على عزلات المجموعة AG3 ظهور مرض القشرة السوداء على الدرنات الناتجة، باستثناء مكرر واحد فقط والتابع للعزلة AG3P وذلك عند التركيز الأدنى 1.5 غ مستحضر تجاري، وهذا مؤشر جيد للحصول على درنات نظيفة. ووجد أنه كلما زاد تركيز المبيد قلت مساحة التقرحات على التاج والمدادات التي تحدثها كل من AG3، AG3P، AG3R وهذا مبين في الجدول (30).

جدول 30: **نتائج تأثير التراكيز الثلاثة للمبيد tolclofos methyl في عزلات المجموعة التشابكية AG3 ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية.**

المجموعة التشابكية	المعاملة غ/كغ	التفاعل مع الصنف القابل للإصابة	التقرح/ مم
	1.5	تقرح التاج + المدادات + الجذور	تراوح تقرح التاج من 2– 10مم / 2 مم على المدادات.
	3	تقرح التاج + المدادات + الجذور	التقرح على التاج والمدادات أقل من1 مم
AG3	6	تقرح التاج + المدادات + الجذور	التقرح على التاج والمدادات أقل من1 مم
	1.5	تقرح التاج + المدادات + الجذور + القشرة سوداء	تراوح تقرح التاج من10– 45 مم / 1–4 مم على المدادات.
	3	تقرح التاج + المدادات + الجذور	تراوح تقرح التاج من1– 20 مم / 1–5 مم على المدادات
AG3 P	6	تقرح التاج + المدادات + الجذور	تراوح تقرح التاج من1– 10 مم/ 1 مم على المدادات
	1.5	تقرح التاج + المدادات + الجذور	تراوح تقرح التاج من10– 45 مم / 15 مم على المدادات.
	3	تقرح التاج + المدادات + الجذور	تراوح تقرح التاج من 5– 10 مم / 2 مم على المدادات.
AG3 R	6	تلونات بنية على الساق+ تقرح المدادات + الجذر	تقرح التاج أقل من 2 مم /1 مم على المدادات.

وزن الدرنات:

أظهرت نتائج تجربة المكافحة الكيميائية للفطر *R. solani* باستخدام أربعة تراكيز من المبيد Rizolex (0، 1.5، 3، 6 غ مستحضر تجاري/كغ) طبقت على عزلات المجموعة التشابكية AG3 للفطر *R. solani* وهي المجموعة التي ثبت أنها الأكثر خطورة على زراعة البطاطا (حسب نتائج التجربة السابقة: AG3، AG3 p، .AG3 R. اعتبرت المعاملة 0 غ/كغ هي معاملة الشاهد. أظهرت النتائج وجود تباين في وزن درنات الصنف القابل للإصابة Benella المختبر إزاء معاملة تراكيز المبيد Rizolex، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق متوسطة المعنوية (F pr.= 0.067) في وزن الدرنات بين معاملات تراكيز المبيد بغض النظر عن عزلات المجموعة التشابكية، وكانت معاملة التركيز الأفضل في الحد من تأثير الفطر في تخفيض وزن الدرنات هي معاملة التركيز 1.5 غ/كغ بشكل عام (جدول 31).

جدول 31: **متوسط وزن الدرنات بالغرام لمعاملات تراكيز المبيد بغض النظر عن عزلات المجموعة التشابكية**

جدول المتوسطات لمعاملة تراكيز المبيد

Rzlx	0 g/kg	1.5 g/kg	3 g/kg	6 g/kg
AGs	*6.2899 [bcd]	20.2551[a]	10.8264 [abc]	19.6457 [ab]

L.S.D.$_{0.05}$ (Rzlx)= 13.57; C.V.= 13.5%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

وعند المقارنة بين عزلات المجموعة التشابكية × تراكيز المبيد نجد أن المعاملة الأفضل هي6 غ/كغ للعزلة AG3 R و1.5 غ/ كغ عندالعزلة AG3 (جدول 32)

جدول 32:**متوسط وزن الدرنات بالغرام لمعاملات تراكيز المبيد مع الأخذ بعين الإعتبار عزلات المجموعة التشابكية**

جدول المتوسطات لعزلات المجموعة التشابكية × معاملة المبيد

AGs * Rzlx	0 g/kg	1.5 g/kg	3 g/kg	6 g/kg
AG3	*2.70574 [cdefghijk]	33.3511[ab]	14.6037 [bcde]	0.399202 [cdefghijkl]
AG3 P.	7.02159 [cdefghi]	9.99862 [bcdefg]	6.98244 [cdefghij]	19.7852[abc]
AG3 R.	9.14256 [cdefgh]	17.4157[abcd]	10.893 [bcdef]	38.7528[a]

L.S.D.$_{0.05}$ (AGs*Rzlx)= 23.50; C.V.= 13.5%

* المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً أو أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.

عدد الدرنات:

أظهرت نتائج التجربة وجود تباين في عدد درنات الصنف القابل للإصابة Benella المختبر إزاء العزلات الثلاث وتراكيز المبيد Rizolex، وبفروقات غير معنوية (F pr.= 0.175). أما بالنسبة لعدد الدرنات إزاء تراكيز المبيد Rizolex، وبغض النظر عن عزلات المجموعة التشابكية، فقد تفوقت المعاملة 1.5 غ/كغ بمتوسط عدد درنات بلغ 2.9994 درنة/النبات على المعاملتين الأخرتين 3 غ/كغ (1.9798 درنة/النبات) و6 غ/كغ (1.9452 درنة/النبات) مقارنة مع عددها في معاملة الشاهد (2.3008 درنة/النبات) بفروق غير معنوية (جدول 33).

جدول 33: **متوسط عدد الدرنات إزاء تراكيز المبيد Rizolex وبغض النظر عن عزلات المجموعة التشابكية.**

جدول المتوسطات لعزلات المجموعة التشابكية × معاملة المبيد

Rzlx	**0 g/kg**	**1.5 g/kg**	**3 g/kg**	**6 g/kg**
AG3	2.3008	2.9994	1.9798	1.9452

L.S.D.$_{0.05}$ (AGs*Rzlx)= 1.572; C.V.= 3.8%

وعند دراسة التآثر فيما بين معاملتي المجموعات التشابكية وتراكيز المبيد Rizolex معاً تبين أن أفضل المعاملات هي معاملة 1.5 غ/كغ للعزلة AG3 بمتوسط عدد درنات بلغ 3.9991 درنة/النبات، بينما كانت المعاملة 6 غ/كغ للعزلة AG3 أسوأ المعاملات بمتوسط عدد درنات بلغ 0.4881 درنة/النبات، وتراوح عدد الدرنات لباقي المعاملات ضمن المجال 3.85798 – 1.48947 درنة/النبات (جدول 34)

جدول 34: **متوسط عدد الدرنات بالغرام لمعاملات تراكيز المبيد مع الأخذ بعين الإعتبار لعزلات المجموعة التشابكية**

جدول المتوسطات لعزلات المجموعة التشابكية × معاملة المبيد

AGs * Rzlx	**0 g/kg**	**1.5 g/kg**	**3 g/kg**	**6 g/kg**
AG3	*2.41081 ^{abcde}	3.9991 ^{a}	2.49108 ^{abcd}	0.488177 ^{cdefghi}
AG3 P.	2.49108 ^{abcd}	2.00052 ^{abcdef}	1.95914 ^{abcdefg}	1.48947 ^{abcdefgh}
AG3 R.	2.00052 ^{abcdef}	2.9987 ^{abc}	1.48947 ^{abcdefgh}	3.85798 ^{ab}

L.S.D.$_{0.05}$ (AGs*Rzlx)= 2.723; C.V.= 3.8%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً أو أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

المعاملة الرابعة (المكافحة الأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp.):

أدت إضافة الفطر التضادي إلى عدم ظهور مرض القشرة السوداء على الدرنات المعداة بالمجموعة AG3P وهي المجموعة الأكثر ضرراً والمتخصصة على البطاطا، في حين تشكلت الأجسام الحجرية على الدرنات المعداة بالعزلتين AG3 وAG3R. وكانت التقرحات متماثلة نوعاً ما على المدادات في العزلات الثلاث التابعة للمجموعة AG3، بينما كان التقرح أكبر عند الإعداء بالعزلتين AG3 وAG3R مقارنة بالعزلة AG3P وهذا مبين في الجدول (35).

جدول 35: **نتائج تأثير المكافحة الأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp. في عزلات المجموعة التشابكية AG3 ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

المعاملة الخامسة Rhizoctonia × Trichoderma		
المجموعة التشابكية	**التفاعل مع الصنف القابل للإصابة (بينيلا)**	**التقرح/ مم**
AG3	تقرح التاج +مدادات+ الجذر +القشرة السوداء	تراوح تقرح التاج من1− 29 مم /3 مم على المدادات
AG3 P	تقرح التاج + مدادات+ الجذر	تراوح تقرح التاج من1− 10 مم / 1−2 مم على المدادات
AG3 R	تقرح التاج+المدادات+الجذر+القشرة السوداء	تراوح تقرح التاج من1− 20 مم /2 مم على المدادات

وزن الدرنات:

أظهرت نتائج تجربة المكافحة الأحيائية لثلاث عزلات تابعة للمجموعة التشابكية AG3 من الفطر *R. solani* باستخدام الفطر *Trichoderma* sp. وجود تباين في وزن الدرنات المنتجة من النباتات المعاملة، حيث اعتبرت المعاملة التي لم يضاف إليها الفطر *Trichoderma* sp. معاملة الشاهد. وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.005) في وزن الدرنات فيما بين معاملات العزلات التشابكية بغض النظر عن المعاملة بالفطر *Trichoderma* sp.، حيث كانت المعاملة .AG3 R هي المعاملة الأقل تخفيضاً لوزن الدرنات بمتوسط وزن درنات بلغ 29.44 غ تلتها العزلة AG3 9.89 غ وكانت العزلة.AG3 P المجموعة الأسوأ والأكثر تخفيضاً لوزن الدرنات 7.26 غ، فقد خفضت كلاً من المجموعتين التشابكيتين .AG3 P وAG3 وزن الدرنات بفروق عالية المعنوية بالمقارنة مع العزلة.AG3 R، ولم تكن هناك فروق معنوية فيما بينهما (جدول 36).

جدول 36: **متوسط وزن الدرنات بالغرام عند الإعداء بالعزلات التشابكية AG3 و.AG3 P و AG3 R. دون إضافة الفطر التضادي *Trichoderma* sp.**

جدول المتوسطاتلعزلات المجموعةالتشابكية

AG3	*9.89423[bc]
AG3 P.	7.262055[b]
AG3 R.	29.44495[a]
L.S.D.$_{0.05}$ = 12.25; C.V.= 10.1%	

* المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.

وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.005) في وزن الدرنات فيما بين تلك المعاملة بالفطر *Trichoderma* sp. والشاهد بقطع النظر عن العزلات التشابكية، حيث تفوقت المعاملة بالفطر *Trichoderma* sp. على الشاهد بفرق عالي المعنوية واستطاعت هذه المعاملة أن تقلل من الانخفاض في وزن الدرنات بالمقارنة مع الشاهد غير المعامل (جدول 37).

جدول 37: **متوسط وزن الدرنات بالغرام .نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية بغض النظر عن العزلة التشابكية**

جدول المتوسطات للعزلات التشابكية

Trichoderma	غير معامل	معامل
	*7.62234[b]	23.44515[a]
L.S.D.$_{0.05}$ = 10.00; C.V.= 10.1%		

* المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.

وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.016) في وزن الدرنات فيما بين المعاملة بالفطر *Trichoderma* sp. مع معاملة العزلات التشابكية. حيث كانت أفضل المعاملات هي المعاملة *Trichoderma* × AG3 R. بمتوسط وزن درنات بلغ 47.41 غ وأسوأ معاملة هي معاملة الشاهد AG3 بمتوسط وزن درنات بلغ 2.25 غ (جدول 38).

جدول 38:**متوسط وزن الدرنات بالغرام للعزلات التشابكية عقب استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام الفطر *Trichoderma* sp.**

جدول المتوسطات للعزلاتالتشابكية

Trchoderma	غير معامل	معامل
AG3	*2.24616[bcdef]	17.5423[b]
AG3 P.	9.14256[bcd]	5.38155[bcde]
AG3 R.	11.4783[bc]	47.4116[a]
L.S.D.$_{0.05}$ = 17.32; C.V.= 10.1%		

* المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً أو أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.

عدد الدرنات:

أظهرت نتائج التجربة تبايناً في عدد الدرنات، وبيّن التحليل الإحصائي وجود فروق ظاهرية (F pr.= 0.099) في عدد الدرنات فيما بين المعاملة بالفطر *Trichoderma* sp. والشاهد بقطع النظر عن العزلات التشابكية (جدول 39).

جدول 39: **متوسط عدد الدرنات. نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية بغض النظر عن العزلة التشابكية**

جدول المتوسطات لمعاملة الفطر *Trichoderma* sp.

Trchdrm	**غير معامل**	**معامل**
	2.20013	3.73825

L.S.D.$_{0.05}$ = 1.953; C.V.= 5.2%

وبين التحليل الإحصائي وجود فروق غير معنوية (F pr.= 0.299) في عدد الدرنات فيما بين معاملة الفطر *Trichoderma* × العزلات التشابكية (جدول 40).

جدول 40:**متوسط عدد الدرنات بالغرام للنباتات المعداة بالعزلات التشابكية عقب استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام الفطر *Trichoderma* sp.**

جدول المتوسطات للعزلاتالتشابكية × *Trichoderma*

Trichoderma	**غير معامل**	**معامل**
AG3	2.27439	4.38799
AG3 P.	2.33105	1.96741
AG3 R.	1.99499	4.85936

L.S.D.$_{0.05}$ = 3.382; C.V.= 5.2%

أي أن إضافة الفطر *Trichoderma* sp. أدت إلى زيادة في وزن الدرنات وبفرق معنوي بغض النظر عن العزلة التشابكية، أيضاً كان هناك فرق معنوي بين التآثر بين إضافة الفطر التضادي والعزلة AG3 R في زيادة وزن الدرنات، وكان للفطر التضادي أيضاً دوراً في زيادة وزن الدرنات عند الإعداء بالعزلة AG3 ولكن بفرق غير معنوي، في حين لم يؤثر الفطر التضادي في خفض وزن الدرنات التي سببتها العزلة AG3P (جدول 39).

أدت إضافة الفطر *Trichoderma* sp. أيضاً إلى زيادة في عدد الدرنات وبفارق معنوي ظاهري بغض النظر عن العزلة التشابكية، ولكن لم يكن لإضافته دور معنوي في زيادة عدد الدرنات مع الأخذ بعين الإعتبار العزلة التشابكية المستخدمة في الإعداء.

- **المعاملة الخامسة (المكافحة الكيميائية باستخدام tolclofos methyl والأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp):**

أدى التأثير المزدوج للفطر *Trichoderma* والمبيد ريزولكس في عزلات المجموعة AG3، إلى عدم السماح بظهور مرض القشرة السوداء على الدرنات الناتجة، ولم يسمح بإصابة التاج لدى العزلة AG3، وهذا مبين في الجدول(41).

جدول 41: **نتائج التأثير المزدوج للمكافحة الكيميائية والأحيائية في عزلات المجموعة التشابكية AG3 ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

المجموعة التشابكية	التفاعل مع الصنف القابل للإصابة	التقرح/ مم
AG3	تقرح المدادات + الجذر	تقرح المدادات 2 مم
AG3 P	تقرح التاج+ المدادات + الجذر	تراوح تقرح التاج من1–37 مم /1–5 مم على المدادات
AG3 R	تلونات بنية على التاج+ تقرح المدادات + الجذر	تقرح التاج من1 مم /1– 10 مم على المدادات

وزن الدرنات:

أظهرت نتائج تجربة المكافحة الكيميائية باستخدام المبيد Rizolex باقتران مع المكافحة الأحيائية باستخدام الفطر *Trichoderma* sp. إزاء العزلات الثلاث التابعة للمجموعة التشابكية AGs-3 للفطر *R. solani* وهي: AG3، AG3 p، AG3 R.، وجود تباين في وزن الدرنات، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.013) في وزن الدرنات من النباتات المعداة بالمجموعات التشابكية الثلاث بغض النظر عن المعاملة Rizolex + *Trichoderma*، حيث كانت المعاملة.AG3 P المعاملة الأكثر تخفيضاً لوزن الدرنات بمتوسط وزن درنات بلغ 4.02 غ تلتها العزلة AG3 6.90 غ ثم أخيراً المجموعة .AG3 R بوزن 15.98 غ، وكانت هذه المعاملة هي المعاملة الأقل تخفيضاً لوزن الدرنات (جدول 42).

جدول 42: **متوسط وزن الدرنات بالغرام للنباتات المعداة بعزلات المجموعة التشابكية AG3 دون استخدام المكافحة**

جدول المتوسطات للعزلاتالتشابكية

AG3	*6.89602[bc]
AG3 P.	4.01849[b]
AG3 R.	15.97603[a]
L.S.D.$_{0.05}$= 7.99; C.V.= 6.3%	

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

وبين التحليل الإحصائي وجود فروق غير معنوية (F pr.= 0.109) في وزن الدرنات فيما بين معاملة *Trichoderma* + Rizolex والشاهد غير المعامل بقطع النظر عن العزلات التشابكية (جدول 43).

جدول 43: **متوسط وزن الدرنات بالغرام نتيجة استخدام المكافحة الكيميائية والأحيائية معاً بغض النظر عن العزلة التشابكية**

جدول المتوسطات للعزلات التشابكية

Trchdrm_Rzlx	**غير معامل**	**معامل**
	6.28996	11.63706
L.S.D.$_{0.05}$ = 6.52; C.V.= 6.3%		

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

كما بين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.02) في وزن الدرنات فيما بين المعاملات *Trichoderma* + Rizolex × الإعداء بالمجموعات التشابكية وكانت أفضل المعاملات هي *Trichoderma* + Rizolex × AG3 R. بمتوسط وزن درنات بلغ 22.81 غ وأسوأها معاملة *Trichoderma* + Rizolex × AG3 P. بمتوسط وزن درنات بلغ 1.02 غ (جدول 44).

جدول 44: **متوسط وزن الدرنات بالغرام من النباتات المعاملة باستخدام المكافحة الكيميائية والأحيائية مع الأخذ بعين الاعتبار العزلة التشابكية**

جدول المتوسطات للمجموعات التشابكية

Trchdrm_Rzlx	**غير معامل**	**معامل**
AG3	*2.70574[bcde]	11.0863[ab]
AG3 P.	7.02159[bcd]	1.01539[bcdef]
AG3 R.	9.14256[bc]	22.8095[a]
L.S.D.$_{0.05}$ = 11.30; C.V.= 6.3%		

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

عدد الدرنات:

أظهرت نتائج التجربة وجود تباين في عدد الدرنات، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق ظاهرية غير معنوية (F pr.= 0.785) في عدد الدرنات (جدول 45).

جدول 45: **متوسط عدد الدرنات بالغرام من النباتات المعاملة باستخدام المكافحة الكيميائية والأحيائية مع الأخذ بعين الاعتبار العزلة التشابكية المستخدمة في الإعداء**

جدول المتوسطات للمجموعات التشابكية

Trchdrm_Rzlx	**غير معامل**	**معامل**
AG3	2.41652	1.96741
AG3 P.	2.50259	0.990058
AG3 R.	1.99499	1.48154

$L.S.D._{0.05}$= 3.131; C.V.= 4.0%

المعاملة السادسة (المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis*):

أدى استخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* على النباتات المعداة بالعزلتين AG3 وAG3 R إلى عدم إصابة المنطقة التاجية، في حين ظهر مرض القشرة السوداء على الدرنة الأم والدرنات الناتجة وبنسبة 90 %، كما هو موضح في الجدول (46).

جدول 46 : **نتائج تأثير المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* في عزلات المجموعة التشابكية AG3 وضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

المعاملة الثامنة *Bacillus subtilis × Rhizoctonia*

المجموعة التشابكية	**التفاعل مع الصنف القابل للإصابة**	**التقرح/ مم**
AG3	تقرح المدادات+الجذر + أجسام حجرية على الدرنة الأم والناتجة90%	تقرح المدادات 7 مم
AG3 R	تقرح المدادات+الجذر+ أجسام حجرية على الأم 90%	تقرح المدادات 1 مم

وزن الدرنات:

أظهرت نتائج تجربة المكافحة الأحيائية للنباتات المعداة بعزلتي AG3 و.AG3 R للفطر *R. solani* باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* وجود تباين في وزن درنات النباتات المعاملة، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق عالية المعنوية (F pr.= 0.011)، حيث تفوقت المعاملة بالبكتيريا على معاملة الشاهد بفارق معنوي بقطع النظر عن العزلة التشابكية (جدول 47).

جدول 47: **متوسط وزن الدرنات بالغرام نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* بغض النظر عن العزلة التشابكية**

جدول المتوسطات للعزلاتالتشابكية

Bctr	**غير معامل**	**معامل**
	*6.86223[b]	17.954[a]

L.S.D.$_{0.05}$ = 9.77; C.V.= 8.2%

وبالنسبة للتآثر ما بين معاملة البكتيريا × االعزلات التشابكية، بين التحليل الإحصائي وجود فروق ظاهرية غير معنوية (F pr.= 0.482) بين المعاملات، وكانت أفضل المعاملات هي معاملة البكتيريا × AG3 R. بمتوسط وزن درنات بلغ 22.73 غ وأسوأها معاملة الشاهد AG3 بمتوسط وزن درنات بلغ 2.25 غ جدول (48).

جدول 48: **متوسط وزن الدرنات بالغرام نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية مع الأخذ بعين الاعتبار العزلات التشابكية**

جدول المتوسطات للعزلات التشابكية

Bctr	**غير معامل**	**معامل**
AG3	*2.24616[bcd]	13.1739[ab]
AG3 R	11.4783[abc]	22.7341[a]

L.S.D.$_{0.05}$ = 13.81; C.V.= 8.2%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً أو أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

عدد الدرنات:

أظهرت نتائج التجربة أيضاً وجود تباين في عدد الدرنات، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.027) في عدد الدرنات فيما بين معاملة البكتيريا والشاهد، حيث تفوقت

معاملة البكتيريا على الشاهد واستطاعت أن تحد من تأثير الممرض في تخفيض عدد الدرنات (جدول 49).

جدول 49: متوسط عدد الدرنات جراء استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* بغض النظر عن العزلة التشابكية

جدول المتوسطات للعزلاتالتشابكية

Bctr	غير معامل	معامل
	2.13469[b]	4.103685[a]

L.S.D.$_{0.05}$ = 1.714; C.V.= 3.5%

* المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.

وبين التحليل الإحصائي أيضاً وجود فروق ظاهرية غير معنوية (F pr.= 0.369) فيما بين معاملة البكتيريا × معاملة المجموعات التشابكية (جدول 50).

جدول 50: متوسط عدد الدرنات نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية مع الأخذ بعين الاعتبار العزلة التشابكية المستخدمة في الإعداء

جدول المتوسطات للعزلاتالتشابكية

Bctr	غير معامل	معامل
AG3	2.27439[abc]	3.55189[ab]
AG3 R	1.99499[bcd]	4.65548[a]

L.S.D.$_{0.05}$ = 2.424; C.V.= 3.5%

* المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً أو أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.

حيث أدى استخدام البكتيريا *B. subtilis* إلى زيادة في وزن الدرنات وعددها بغض النظر عن المجموعة التشابكية، وبفروق معنوية، في حين لم يكن له دور معنوي عند الأخذ بعين الإعتبار للمجموعة التشابكية.

المعاملة السابعة (المكافحة الأحيائية باستخدام (*Bacillus subtilis* & *Trichoderma* sp مع الصنف بينيلا):

أدت إضافة البكتيريا والفطر التضادي كعنصري مكافحة أحيائية، إلى إصابة المدادات والجذر، وأصيبت الدرنة الأم والدرنات الناتجة بمرض القشرة السوداء، ولكن لم تظهر الإصابة على التاج وهذا موضح في الجدول(51).

جدول 51: **نتائج تأثير المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* والفطر *Trichoderma* sp. في المجموعة التشابكية AG3 ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

المعاملة Rhizoctonia × Bacteria × Trichoderma		
المجموعة التشابكية	**التفاعل مع الصنف القابل للإصابة**	**التقرح/ مم**
AG3	المدادات+ الجذر + مرض القشرة السوداء على الدرنات الأم والناتجة	تقرح المدادات 5 مم
AG3 R	المدادات+ الجذر +مرض القشرة السوداء على الدرنة الأم والناتجة	تقرح التاج 1مم/15 مم على المدادات

وزن الدرنات:

أظهرت نتائج تجربة المكافحة الحيوية للنباتات المعداة بالعزلتين التابعتين للمجموعة التشابكية AG3 للفطر *R. solani* وهما AG3 وAG3 R. باستخدام الفطر *Trichoderma* sp. مع البكتيريا *B. subtilis* وجود تباين في وزن درنات النباتات المعاملة، وبيّن التحليل الإحصائي وجود فروق عالية المعنوية (F pr.< 0.001) في وزن الدرنات فيما بين معاملة البكتيريا مع الفطر *Trichoderma* والشاهد بقطع النظر عن العزلتين المستخدمتين، حيث تفوقت معاملة البكتيريا مع الفطر *Trichoderma* على الشاهد بفارق عالي المعنوية واستطاعت هذه المعاملة أن تحد من تأثير الممرض في تخفيض وزن درنات النبات المعامل (جدول 52).

جدول 52: **متوسط وزن الدرنات بالغرام نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* والفطر *Trichoderma* sp بغض النظر عن عزلة المجموعة التشابكية المستخدمة في الإعداء.**

جدول المتوسطات لعزلات المجموعة التشابكية

Bctr_Trichoderma	غير معامل	معامل
	*6.86223[b]	23.05414[a]

L.S.D.$_{0.05}$ = 6.57; C.V.= 4.9%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

وبين التحليل الإحصائي وجود فروق ظاهرية غير معنوية (F pr.= 0.086) فيما بين معاملة البكتيريا مع الفطر *Trichoderma* × المجموعات التشابكية جدول (53).

جدول 53: **متوسط وزن الدرنات بالغرام نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* والفطر *Trichoderma* sp مع الأخذ بعين الاعتبار عزلات المجموعة التشابكية**

جدول المتوسطاتلعزلات المجموعة التشابكية

Bctr_Trchdrm	غير معامل	معامل
AG3	2.24616[bcd]	8.79317[bc]
AG3 R	11.4783[b]	37.3151[a]

L.S.D.$_{0.05}$ = 9.29; C.V.= 4.9%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً أو أفقياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

عدد الدرنات:

أظهرت نتائج التجربة وجود تباين في عدد الدرنات، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق ظاهرية غير معنوية (F pr.= 0.81) في عدد الدرنات فيما بين معاملة البكتيريا مع الفطر *Trichoderma* × معاملات المجموعات التشابكية (جدول 54).

جدول 54: **متوسط عدد الدرنات. نتيجة استخدام المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis* والفطر *Trichoderma* sp في عزلتي المجموعة التشابكية AG3 المستخدمة في الإعداء.**

جدول المتوسطات لعزلتي المجموعة التشابكية

Bctr_Trchdrm	غير معامل	معامل
AG3	2.27439	4.09289
AG3 R	1.99499	3.27394

L.S.D.$_{0.05}$ = 3.996; C.V.= 5.5%

المعاملة الثامنة: قابلية إصابة بعض أصناف البطاطا بالمجموعة AG3 للفطر *R. solani*

اختبرت قابلية ثلاثة أصناف من البطاطا (بينيلا وسبونتا ودراجا) للإصابة بالمجموعة AG3، وقد ظهر مرض القشرة السوداء على درنات الأصناف الثلاثة، وكان تقرح التاج أكبر عند الصنف دراجا من الصنفين الآخرين ووصل حتى 20 مم، في حين كان تقرح المدادات أعلى عند الصنف بينيلا وبلغ 5 مم. وهذا مبين في الجدول (55).

جدول 55: **نتائج حساسية الأصناف الثلاث (بينيلا_سبونتا- دراجا) للمجموعة التشابكية AG3 ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية**

الأصناف	التفاعل مع الصنف	التقرح / سم
سبونتا	تقرح التاج +مدادات+ الجذر +القشرة السوداء	تراوح تقرح التاج من1−10 مم/1 مم على المدادات
دراجا	تقرح التاج + مدادات+ الجذر +القشرة السوداء	تراوح تقرح التاج من1−20 مم /1 مم على المدادات
بينيلا	تقرح التاج + مدادات+ الجذر +القشرة السوداء	تقرح التاج 2 مم / 5 مم على المدادات

وزن الدرنات:

أظهرت النتائج وجود تباين في وزن درنات الأصناف المختبرة المعداة بالمجموعة AG3 للفطر *R. solani*، وبيّن التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.023) في وزن الدرنات فيما بين الأصناف المختبرة، حيث تفوق الصنف سبونتا بمتوسط وزن درنات بلغ 45.21 غ على الصنف بينيلا (11.48 غ) بفارق عالي المعنوية، وتفوق الصنف دراجا (39.66 غ) على الصنف بينيلا بفارق ظاهري ولم يكن هناك فرق معنوي بين الصنفين سبونتا ودراجا جدول (56).

جدول 56:**متوسط وزن الدرنات بالغرام لأصناف البطاطا (بينيلا، سبونتا، دراجا) المعداة بالمجموعة التشابكية AG3**

وزن الدرنات/غ	.الصنف
39.6592^{ab}	دراجا
11.4783^{bc}	بينيلا
45.2077^{a}	سبونتا
	$L.S.D._{0.05}$ = 29.64; C.V.= 7.3%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

عدد الدرنات:

أظهرت النتائج وجود تباين في عدد درنات الأصناف المختبرة إزاء الممرض *R. solani*، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (F pr.= 0.021) في عدد الدرنات فيما بين الأصناف المختبرة. حيث تفوق الصنف سبونتا بمتوسط عدد درنات بلغ 6.52 درنة/النبات على الصنف بينيلا (1.99 درنة/النبات) بفارق عالي المعنوية وتفوق الصنف دراجا (4.66 درنة/النبات) على الصنف بينيلا بفارق ظاهري ولم يكن هناك فرق معنوي بين الصنفين سبونتا ودراجا (جدول 57).

جدول 57: **متوسط عدد الدرنات لأصناف البطاطا (بينيلا، سبونتا، دراجا) المعداة بالمجموعة التشابكية AG3**

الصنف	عدد الدرنات
دراجا	4.65548^{ab}
بينيلا	1.99499^{bc}
سبونتا	6.51962^{a}

L.S.D.$_{0.05}$= 3.023; C.V.= 3.1%

*** المتوسطات المتبوعة بأحرف متشابه عمودياً لا يوجد فروق معنوية فيما بينها.**

تفوق الصنفان سبونتا ودراجا على الصنف بينيلا، ولكن لم تكن هناك فروق معنوية بين الصنف دراجا وبينيلا من حيث الزيادة في وزن الدرنات. أيضاً تفوق الصنفان سبونتا ودراجا على الصنف بينيلا في عدد الدرنات، ولكن لم تكن هناك فروق معنوية بين الصنف دراجا وبينيلا من حيث الزيادة في عدد الدرنات.

4 المناقشة

- **المعاملة الأولى (القدرة الإمراضية للمجموعات التشابكية ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية):**

تباينت المجموعات التشابكية في مكان الإصابة التي أحدثتها على نبات البطاطا، وهذا مأأكده أيضاً Lehtonen ورفاقه (2008) في حقول البطاطا في فنلندا، كما أظهرت عدة تجارب حقلية وفي الدفيئة الزجاجية تباين القدرة الإمراضية ونمط المرض فيما بين المجموعات التشابكية المختلفة AGs للفطر *R. solani*، إذ تطور مرض تقرح الساق والمدادات بشدة عالية، على سبيل المثال، على النباتات المعداة بعزلة مفردة من المجموعة AG3 PT والمجموعة AG5. وتطور مرض تقرح الجذور بشدة عالية على نباتات معداة بعزلات مفردة من المجموعة AG8 وبامتداد أقل من المجموعة AG3 PT (Woodhall *et al.*, 2008). فهناك مجموعة أحدثت إصابة على الجذر فقط مثل AG8،

وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها (Carling & Leiner, 1990a)، اللذين بينا أن هذه المجموعة تحدث تعفن الجذور في المناطق الجافة لإنتاج الحبوب (Jaaffar *et al.*, 2010)، وتهاجم المجموعة AG8 جذور البطاطا وهذا يؤدي إلى الذبول، وقلة المجموع الخضري (Truter& Wehner, 2004). كما أحدثت المجموعتين AG2-2، AG4HGII تشوهاً لشكل الدرنات الناتجة وأحدثتا أعراضاً شبيهة بالجرب، وهذا ما أكده Bienkowski. ورفاقه (2010) من أن الفطر *R. solani* يخفض القيمة التسويقية للدرنات الحديثة، أيضاً أكد Bouchek-Mechiche ورفاقه (2000) أن الفطر *R. solani* يحدث أعراضاً مشابهة لأعراض الإصابة بالجرب. أكدت أبحاث عدة عزل *R. solani* من الأجسام الحجرية التابعة للمجموعة AG2- 1 (Truter&Wehner, 2004; Woodhall *et al.*, 2007) وتأتي هذه النتيجة مؤيدة للنتائج المتحصل عليها خلال هذا البحث، حيث أمكن عزل *R. solani* من الأجسام الحجرية على الدرنات الناتجة والمعداة بهذه المجموعة التشابكية.

بين هذا البحث وضمن ظروف الدفيئة الزجاجية أن المجموعة التشابكية **AG3** هي المجموعة الأكثر شراسة مقارنة بغيرها من المجموعات التشابكية على البطاطا، وهذا يتفق مع دراسات سابقة نفذت ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية (Yanar *et al.*, 2005; Abd-Elsalam *et al.*, 2009)، وكانت المجموعة التشابكية AG3 المجموعة الأكثر تأثيراً في خفض وزن الدرنات مقارنة بالمجموعات التشابكية الأخرى،.بالإضافة إلى مساهمتها في خفض عدد الدرنات، والتأثير في شكل الدرنات، وهذا ماأكدته دراسة سعودية أشارت إلى أن معظم عزلات *R. solani* التابعة للمجموعة التشابكية AG3 سببت خسارة في الغلة وجودة الدرنات (Abd-Elsalam *et al.*, 2009). وأظهرت تجربة الدفيئة الزجاجية أن المجموعة AG5 هي المجموعة الثانية من حيث الخطورة على البطاطا بعد المجموعة AG3 من حيث خفض وزن الدرنات، حيث أثبتت دراسات أن المجموعة AG5 تسبب تعفن الساق والجذر على البطاطا ولكن شدة الإصابة تكون أقل من AG3 (Sneh *et al.*, 1991; Carling & Sumner, 1992).

يعود السبب في كون AG3 هي الأكثر شيوعاً على البطاطا، إلى مقدرتها على تشكيل الأجسام الحجرية على الدرنات، وبالتالي فإن AG3 هي المجموعة الأكثر كفاءة في تشكيل الأجسام الحجرية على الدرنات مقارنة مع المجموعات الأخرى مثل AG2-1 وAG5. بالإضافة إلى طبيعة AG3 المتخصصة بشكل كبير على البطاطا (AG3P)، وفي حال غياب هذا العائل، تقل كثافتها بسرعة وقد تزول نهائياً .(Lehtonen, 2009). وتعتمد القدرة على تشكل الأجسام الحجرية على العوامل البيئية ومدى استجابة العائل، وليس على شراسة العزلة (Chand & Logan, 1983). أي قد يحدث تخصص المجموعات التشابكية على عوائل محددة (Grosch *et al.*, 2004). وتبعاً لـــ Dijst—(1988;

1990)، فإن تشكل الأجسام الحجرية يعتمد على مرحلة نضج الدرنات الناتجة، نتيجة إطلاق غاز CO_2 خلال تنفس النبات، والذي يستخدم كمادة كيميائية ضد تشكل هذه الأجسام. ولكن مع زيادة سطح الدرنات، وضعف الإرتباط بين الدرنات المتشكلة والنبات الأم، تقل كمية المواد الكيميائية المتطايرة تحت التربة، وبالتالي لا تستطيع منع الفطر من تشكيل الأجسام الحجرية.

من المعروف أن الفطر يشكل الأجسام الحجرية في أواخر الموسم، أو عندما تضحي الظروف غير ملائمة. وعلى الرغم من التحكم بدرجة حرارة الدفيئة الزجاجية، إلا أن الصيف المنصرم (صيف 2010) شهد ارتفاع درجة الحرارة أعلى من 55 ْس، ولابدّ من أن يكون لذلك تأثير في درجة حرارة الدفيئة الزجاجية. وقد أسهم ارتفاع درجات الحرارة في تشكل الأجسام الحجرية على الدرنات.

المعاملة الثالثة المكافحة الكيميائية (Chemical control):

كان للمبيد دور في المكافحة، وكان له دور معنوي في زيادة متوسط وزن الدرنات عند الإعداء بالعزلة AG3R، وهناك دراسة تؤكد أنه ليس من الضروري أن تكون المبيدات الكيميائية فعالة، وبخاصة عندما يكون مستوى اللقاح الأولي عالياً، ويكون مصدر اللقاح من التربة (Tsror & Peretz-Alon, 2005).

أدى استخدام المبيد إلى عدم تشكل الأجسام الحجرية على الدرنات الناتجة، باستثناء مكرر واحد فقط معدى بالعزلة AG3P عند التركيز الأدنى، وتأتي هذه النتيجة متوافقة مع نتائج Wicks ورفاقه (1995) التي أشارت إلى أن استخدام المبيد tolclofos methyl ومبيدات أخرى كان لها دور كبير في تقليل نسبة الأجسام الحجرية المتشكلة على درنات البطاطا الناتجة. وتبين خلال تجربة المكافحة الكيميائية ضمن ظروف المختبر، أن معدل نمو AG3P كان أسرع من معدل نمو العزلتين AG3، AG3R، ولم يسمح المبيد بنمو العزلتين AG3، AG3R، في حين نمت العزلة AG3P، وهذه دلالة على أن العزلة AG3P هي الأكثر ضرراً على البطاطا مقارنة مع العزلتين AG3، AG3R.

المعاملة الرابعة (المكافحة الأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp):

وجد أن لإضافة الفطر *Trichoderma* sp. دورفي زيادة وزن الدرنات بوجود المجموعتين AG3R، AG3، في حين لم يؤثر الفطر التضادي في خفض وزن الدرنات بوحود المجموعة AG3P، ويعزى السبب في ذلك إلى أن AG3P هي العزلة الأشرس والمتخصصة على البطاطا. وربما يعود

سبب التأثر الأكبر للمجموعة AG3R بالفطر التضادي عائد لكون كليهما معزول من تربة سورية، أي المصدر واحد،.وأكدت دراسة بأن عزلة واحدة من الكائن المضاد (*Trichoderma* sp) قد تؤثر بشكل كبير ومعنوي في عزلة *R. solani*، ولكن قد يكون تأثيرها محدود في العزلات الأخرى للفطر *R. solani*(Bell *et al.*, 1982). كما أكد Breweer & Larkin (2005) دور بعض المستحضرات التجارية مثل (SoilGard) *Trichoderma virens*، و(RootShield) *T. harzianum*.في مكافحة *R. solani* ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية. وفي دراسة أجراها Wilson ورفاقه (2008a) أن إضافة *Trichoderma* spp مثل *Trichoderma harzianum* مع الفطر *Gliocladium virens* كان له دور في منع أو تقليل نسبة الإصابة بـــ *R. solani* تحت ظروف الدفيئة الزجاجية أوالحقل. وتأتي هذه النتائج مؤيدة لنتائج (Lahlali & Hijri, 2010) اللذين أثبتا مساهمة كل من *T. atroviride* و*Epicoccum nigrum* في تحسين إنتاجية البطاطا ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية. وفي دراسة أنجزت في جامعة عين شمس بمصر بعد تنمية الفطر *T. viride*على وسط ديكستروز البطاطا السائل (PDB) عند 27 ْس لمدة 7 أيام، أخذ جزء من الوسط وعقمت الرشاحة بتمريرها عبر فلتر 0.45 ميكرومترµm، وكان للراشح دور في إيقاف مرض الذبول المتسبب عن *R. solani* على نبات الخيار وذلك تحت ظروف الدفيئة الزجاجية (Roberts *et al.*, 2005). ووجدً أن الأنواع التابعة للفطر *Trichoderma* لها القدرة على حماية النباتات من العدوى التي يسببها *R. solani* وذلك بانتاج مضادات حيوية، ومواد كيميائية مضادة للفطر وأنزيمات الحلمهة (Verma *et al.*, 2007). وأدى استخدام الفطر *Trichoderma viride* وضمن تجربة الدفيئة الزجاجية دوراً في زيادة عدد ووزن الدرنات (Mohammed *et al.*, 2008).

وبشكل عام يتم الإخماد الأكبر للفطر *R. solani* في الترب الحاوية على مستوى عالٍ من مجتمعات *Trichoderma* spp والتي قد تكون من الفطور المتطفلة ذات قدرة تضادية عالية (Chet and Baker, 1981)

- **المعاملة الخامسة (المكافحة الكيميائية باستخدام tolclofos methyl والأحيائية باستخدام *Trichoderma* sp):**

أدى إضافة عنصري المكافحة معاً إلى عدم إصابة الدرنات الناتجة بمرض القشرة السوداء، وبالتالي الحصول على تقاوي نظيفة، وتشير دراسات حديثة أن وجود توليفة من المكافحة الكيميائية ومعاملة التضاد الحيوي antagonist treatment يمكن أن يحمي محصول البطاطا خلال موسم النمو

(Wilson *et al.*, 2008b). ويمكن تطبيق عناصر المكافحة الحيوية مع المكافحة الكيميائية، أو كل على حدا (Duffy, 2000; Wilson *et al.*, 2008b).

المعاملة السادسة (المكافحة الأحيائية باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis*):

أدت إضافة البكتيريا ***Bacillus subtilis*** إلى زيادة في وزن الدرنات وعددها ولكن بشكل غير معنوي، وقد يعود عدم كفاءة البكتيريا بشكل فعال في الدفيئة الزجاجية، كونها كانت معزولة من سنة وتم حفظها في المجمدة، وبالتالي يمكن أن تكون قد فقدت جزءً من حيويتها. خلافاً لما أبدته في ظروف المختبر. وقد بينت دراسات سابقة أن هناك حوالي 28 نوعاً من الكائنات الحية ذات تأثير في الممرض المدروس على محصول البطاطا خلال عدة تجارب نفذت ضمن الدفيئة الزجاجية ومنها: *Paenibacillus polymyxa*، و*Pseudomonas fluorescens*، و*Rhizoctonia zeae*، و *Verticillium biguttatum*، بالإضافة إلى مستحضرات تجارية من (Kodiak) *Bacillus subtilis*. (Breweer & Larkin, 2005). عزيت قدرة *Bacillus subtilis* BR23 في إخماد الذبول، إلى إنتاج البكتيريا للمضادات الحيوية، ومن المحتمل أن ينسب دور السلالة *B.subtilis* QST 713 في مكافحة فطور معينة إلى المنافسة على الغذاء، ومواقع النمو على النباتات، واستعمارها والتصاقها المباشر على الفطور الممرضة (Muis &Quimio, 2006).

المعاملة السابعة المكافحة الأحيائية باستخدام (*Trichoderma* sp & *Bacillussubtilis* مع الصنف بنيلا

تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج تشير إلى أن وجود *Bacillus.subtilis* و*Trichoderma virens* معاً قد أسهما نوعاً ما في مكافحة التقرح التاجي بشكل أكثر فاعلية من المعاملة بكل منهما على حدا (Brewer *et al.*, 2005). كما وجد أن تطبيق مستحضرات تجارية حاوية على أبواغ *Trichoderma harzianum* مع *Bacillus.subtilis* له دور كبير في تثبيط نمو ممرضات النبات (El-Habbaa *et al.*, 2002)

المعاملة الثامنة حساسية الأصناف:

أبدت الأصناف المختبرة قابلية إصابة مختلفة إزاء المجموعة AG3، ولكنها أصيبت جميعا بالفطر المدروس حالما توافرت الظروف الملائمة لنمو الفطر وتطوره، وبالتالي لا توجد أصناف مقاومة لهذا الفطر. وتتوافق نتائج الدراسة أيضاً من أن هناك مدى واسع في قابلية إصابة أصناف البطاطا بالفطر *R. solani*، ولكن لاتوجد أصناف مقاومة للفطر المذكور مع نتائج دراسات أخرى

(Jeger *et al.*, 1996; Bains *et al.*, 2002). وتبقى النتائج غامضة ولاتوجد تقارير متاحة عن استجابات البطاطا للإعداء بالفطر *R. solani* (Lee *et al*., 2006).

الفصل السابع

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات CONCLUSIONS

1. التقرح التاجي ومرض القشرة السوداء الذي يحدثه الفطر *R. solani* من الأمراض المهمة على البطاطا، وينتشر في جميع مناطق زراعة البطاطا في سورية، وتختلف أعراض الإصابة والشدة المرضية باختلاف المجموعة التشابكية المنتمية إليها. وليس للمنشأ الجغرافي للعائل أو اللمجموعة التشابكية دور في ذلك.
2. زراعة درنات أم مصابة لا تؤدي بالضرورة إلى إصابة الدرنات الناتجة بمرض القشرة السوداء، وكذلك فإن زراعة درنات أم سليمة لا تؤدي بالضرورة إلى إنتاج درنات سليمة.
3. تقطيع الدرنات أثناء الزراعة كان له دور في إصابة النباتات بأمراض عديدة ومنها مرض القشرة السوداء.
4. أمكن لأول مرة في سورية تحديد المجموعات التشابكية التي تنتمي لها العزلات السورية، ومعرفة المجموعة التشابكية السائدة والأكثر ضرراً بالبطاطا.
5. معظم العزلات السورية تنتمي للمجموعة AG3، بالإضافة للمجموعة AG1.
6. وجود بعض العزلات السورية التي أحدثت تشابكاً مع أكثر من مجموعة تشابكية.
7. جميع المجموعات التفريقية الموجودة أحدثت إصابة على البطاطا على الصنف بينيلا ضمن ظروف المختبر والدفيئة الزجاجية.
8. الإختلاف في الأعراض التي أحدثتها المجموعات التشابكية ضمن ظروف المختبر عن تلك التي أحدثتها في الدفيئة الزجاجية.
9. تحتل المجموعة AG5 موقع المجموعة التشابكية الثانية الأكثر ضرراً على البطاطا بعد المجموعة AG3 ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية على الصنف بنيلا.
10. نسبة تغطية سطح الدرنة بالأجسام الحجرية كانت أكثر عند AG3 مقارنة مع AG3P ضمن ظروف الدفيئة الزجاجية على الصنف بنيلا.
11. النوع *Bacillus subtilis* المعزول من التربة السورية كان له تأثير تضادي في المجموعة التشابكية AG3 ضمن ظروف المختبر.
12. جميع الأصناف قابلة للإصابة بالممرض المدروس في حال توافر الظروف الملائمة لتطور المرض، مع وجود اختلاف في قابلية الأصناف للإصابة بالفطر المدروس، وعدم وجود أصناف مقاومة له.

13..وجد أن صنف البطاطا سبونتا.كان أقل قابلية للإصابة من الصنفين دراجا وبينيلا وذلك تحت ظروف الدفيئة الزجاجية.

التوصيات والمقترحات SUGGESTIONS

1. توسيع دائرة المسح الحقلي لتشمل كافة مناطق زراعة البطاطا في سورية سواء المروية أوالبعلية كمحافظتي طرطوس واللاذقية.
2. استخدام بذار سليم خال من الأجسام الحجرية، وتجنب الري الزائد،.ومعرفة الإحتياجات المائية لكل صنف، وضرورة تطبيق الدورة الزراعية.
3. معرفة المجموعة التشابكية السائدة والأخذ بعين الإعتبار اختلاف حساسية المجموعات للمبيدات المستخدمة.
4. تحديد المورث المسؤول عن إحداث مرض القشرة السوداء والتقرح التاجي على البطاطا باستخدام التقانات الحيوية.
5. استخدام مجموعات تشابكية أخرى لمعرفة العزلات التي لم تعرف مجموعتها التشابكية.
6. معرفة أنواع الفطر *Trichoderma* spp. المتسمة بتأثير تضادي وإدخالها ضمن برامج المكافحة.
7. عدم التأخر في الحصاد، حتى لا يصبح المحصول عرضة للإصابة بالعديد من الممرضات وبخاصة بمرض القشرة السوداء، والأمراض البكتيرية.
8. البحث عن أصناف مقاومة لهذا المرض، وبخاصة في مرحلة البادرة لأنه يسبب مشكلة هامة.
9. ضرورة تطبيق الدورة الزراعية لتقليل كمية اللقاح في التربة، كون الفطر يمتلك مجالاً عوائلياً واسعاً.

المراجع References:

الورع، حسان. 1977. محاصيل الخضر، مديرية الكتب والمطبوعات، جامعة حلب. 642 صفحة.

فريد، خوري؛ بلال، مصطفى؛ الروح، ليلى؛ رياض، ناهد.1974. حصر الأمراض النباتية، نشرة رقم 55، مديرية الشؤون الزراعية، الإرشاد الزراعي، سورية. 29 صفحة.

خليفة، محمد.2006. مرض تعفن الجذور الشائع على القمح في سورية والتباين الوراثي ضمن *Fusarium* spp كأحد مسبباته الرئيسية، رسالة دكتوراة، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية. 83 صفحة.

Abd-Elsalam, K.A., Moslem, M. A. & Bahkali, A. H. 2009. First morpho-molecular identification of *Rhizoctonia solani* AG-7 from potato tuber-borne sclerotium in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3(12): 952-956.

Abe, H., Tsuboki, K. 1978. Anastomosis groups of isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn from potatoes. *Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Station*, 40:61-70.

Agarwal, M., Shrivastava, N. &. Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27: 617-631.

Anderson, N. A. 1977. Evaluation of the *Rhizoctonia* complex in relation to seedling blight of flax.*Plant disease Reporter*,.61:140-143.

Anderson, N. A. 1982. The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Revue of Phytopathology*, 20: 329-347.

Anderson, J. R., Bentley, S., Irwin, J. A. G., Mackie, J. M., Neate, S. & Pattemore, J. A. 2004.Characterisation of *Rhizoctonia solani* causing root canker of Lucerne in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33:241-247.

Anguiz, R. & Martin, C. 1989. Anastomosis groups, pathogenicity and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. *Plant Disease*, 73: 199-201.

Anon, 2001. European Cultivated Potato Database. http://194.128.220.6/web0/aweb/database.htm

Asaka, O & Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 4081-4085.

Asran, A. A., Abd-Elsalam, K. A., Omar, M. R. & Aly, A. A. 2005. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* and use of M13 microsatellite-primed PCR to evaluate the antagonist genetic variation *Journal of Plant Diseases and Protection*,.**112** (6): 550–561.

Bains, P.S., Bennypaul, H,S., Lynch, D.R.; Kawchuck, L.M.& Schaupmeyer, C.A.2002. Rhizoctonia Disease of Potatoes(*Rhizoctonia solani*): Fungicidal Efficacy and Cultivar Susceptibility. *American Journal of Potato Research*, 79: 99-106.

Bains ,P.S.& Bisht, V.S. 1995. Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. *Plant Disease*, 79, 241-242.

Baker, K.F. 1970.. Types of *Rhizoctonia* diseases and their occurrence. In Parameter, J.R Jr (ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology (pp 125-148) University of California Press, Berkeley.

Balali ,G. R., Neate, S. M., Scott, E. S., Whisson, D. L.& Wicks, T. J. 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. *Plant Pathology*,44: 1050-1057.

Balali, G. R., Whisson, D. L., Scott, E. S. & Neate, S. M. 1996. DNA fingerprinting probe specific to isolates of Rhizoctonia solani AG-3. *Mycological Reseach,* 100(4):467-470.

Bandy, B. P., Zanziger, D. H. & Tavantzis, S. M. 1984. Isolation of anastomosis group 5 of *Rhizoctonia solani* from potato field soils in Maine. *Phytopathology*, 74: 1220-1224.

Banville, G. J. 1989. Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *American Potato Journal*, 66: 821-834.

Banville, G. J., Carling, D. E. & Otrysko, B. E. 1996. *Rhizoctonia* disease on potato. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. (Eds.) *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 321-330.

Bateman, D. F. 1962. Relation of soil pH to development of Poinsettia root rots. *Phytopathology*,52: 559-566.

Bell, D. K., Wells, H. D., Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*,72**:**379–382.

Berggren, B. 1985. Lackskorv, groddbränna och filtsjuka på potatis - en litteraturöversikt över *Rhizoctonia solani*. Växtskyddsrapporter Jordbruk 38. Swedish University of Agricultural Sciences.

Bharadwaj, D. P., Lundquist, P. O.& Alstrom, S. 2007. Impact of plant speciesgrown as monocultures on sporulation and root colonization by native arbuscular mycorrhizal fungi in potato. *Applied. Soil Ecology*, 35(1): 213-225.

Bienkowski, D., Stewart, A., Falloon, R. E., Braithwaite, M., Loguercio, L. L.&Hicks, E.2010. A disease assay for *Rhizoctonia solani* on potato (*Solanum tuberosum*) *New Zealand Plant Protection*, 63: 133-137.http://www.nzpps.org/terms_of_use.html.

Bjørnstad, G. & Røed, K. H. 2001. Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal Genetics*, 32: 59–65.

Bochner, B.R. **1989**. Sleuthing out bacterial identities. *Nature,* 339: 157-158.

Boogert, P. H., Van den, J. F. & Velvis, H. 1992. Population dynamics of the mycoparasite *Verticillium bigttatum* and its host,*Rhizoctonia solani* . *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 157-164.

Botha, A., Denman, S., Lamprecht, S.C., Mazzola, M. & Crous, P. W. 2003. Characterisation and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with black root rot of strawberries in the Western Cape Province, South Africa.*Australasian Plant Pathology*,.32:195-201.

Bouchek-Mechiche, K., Pasco, C., Andrivon, D. & Jouan, B. 2000. Differences in host range, pathogenicity to potato cultivars and response to soil temperature among *Streptomyces* species causing common and netted scab in France. *Plant Pathology*,49: 3–10.

Breweer, M.T.& Larkin, R.P. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato.*Crop Production*, 24(11): 939-950.

Campion, C., Chatot, C., Perraton, B.& Andrivon, D. 2003. Anastomosis groups, Pathogenicity and Sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolates collected on potato crops in France. *European Journal of Plant Pathology,* 109: 983-992.

Carling, D.E.; Baird, R.E.; Gitaitis, R.D.; Brainard, K.A. &Kuninage, S. 2002a. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosi group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology,*92:893-899.

Carling, D. E., Brainard, K.A., Virgen-Calleros, G. & Olade-Portugal, V. 1998. First report of *Rhizoctonia solani* AG 7 on potato in Mexico. *Plant Disease*, 82:127.

Carling, D. E. & Leiner, R. H. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani* like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology*, 76: 725-729.

Carling, D. E. & Leiner, R. H. 1990a. Virulence of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 collected from potato organs and soil. *Plant Disease,* 74: 901-903.

Carling, D. E. & Leiner, R. H. 1990b. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopatholog*y, 80:930-934.

Carling, D. E., Leiner, R. H. & Kebler, K. M. 1987. Characterization of new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 77: 1609-1612.

Carling, D. E.; Leiner, R. H. & Westphale, P. C. 1989. Symptom signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuber-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. *American Potato Journal*, 66: 693-702.

Carling, D. E., Meyer, L. & Brainard, K. A. 1996. Crater disease of wheat caused by *Rhizoctonia solani* AG-6. *Plant Disease,* 80:1429.

Carling, D. E. & Sumnar, D. R. 1992. Rhizoctonia Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi(eds.Singleton,L.L.,Mihail,J.D & Rush,C.M), pp157-165.AmericanPhytopathological Society, St,Paul, MN, USA.

Carling, D. E., Pope, E. J., Brainard, K. A. & Carter, D. A. 1999. Characterization of mycorrhizal isolate of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG12, a new anastomosis group. *Phytopathology*, 98: 942-946.

Carling, D. E., Virgen.Calleros, G. & Olalde-Portugal, V. 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in central México and potential for biological and chemical control. *American Potato Journal*, 77: 219-224.

Carling, D. E., Kuninga, S. & Brainard, K.A. 2002b. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* AG 2 and AG B1. *Phytopathology*, 92: 43-50. *BMC Plant Biology* 2009, **9:**95doi:10.1186/1471-2229-9-95.

Cedeno, L., Carrero, C., Quintero, k., Arouja, Y., Pino, H. & Garcia, R. 2001. Identification and virulence of anastomosis groups in *Rhizoctonia solani* Kühn associated with potato in Merida, Venzuela. *Interciencia*, 26:296-300.

Ceresini, P. 1999. *Rhizoctonia solani.*Pathogen profile, as one of the requirement of the course pp-728 Soilborne Plant Pathogens. North Carolina State University.

Ceresini, P. C., Shew, H. D., James, T. Y., Vilgalys, R. J. & Cubeta, M. A. 2007 . Phylogeography of the Solanaceae-infecting Basidiomycota fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 based on sequence analysis of two nuclear DNA loci. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 163-184.

Ceresini, P. C., Shew, H.D., Vilgalys, R. J. & Cubeta, M. A. 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG3 from potato and tomato in North Carolina. *Mycologia*,.94:437-449.

Chand, T. & Logan, C. 1983. Cultural and pathogenic variation in potato isolates of *Rhizoctonia solani* in Northren Ireland.*Transactions of the British Mycological Society*, 81:585-589.

Chang, Y. C. & Tu, C. C. 1980. Pathogenicity of different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. to potato. *Journal of Agricultural Research of China,* 29: 1 (abstract).

Chet, I. & Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*,71: 286-290.

Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of. Bacteriol*ogy,**174**: 1550-1557. PMID 8432.

Coddington, A. & Gould, D. S. 1992. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. In: Techniques for rapid detection of plant pathogens.Ducan, J. M. & Torrance (Eds.), L. Blackwell Scientific Publications,pp: 162-176.

Csinos, A. s. & Stephenson, R. 1999. Evaluation of fungicides and tobacco cultivar resistance to *Rhizoctonia solani* incited target spot, damping off and sore shin. *Crop Protection*, 18: 373-377.

Cubeta, M. A., Cody, B. R. & Ceresini, P. C. 1998. Rhizoctonia disease of potato.Vegetabtable Disease Information Note No.26, Department of Plant Pathology,North Carolina State University.

Cubeta, M. A. & Echandi, E., Abernethy, T. & Vilgalys, R. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* 81: 1395-1400.

Cubeta, M. A., Vilgalys, R. 2000. Rhizoctonia. *In*: Encyclopedia of Microbiology Edited by: Lederberg J. San Diego: Academic Press. 4: 109–116.

Demirci, E. & Doken M. T. 1993. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Kühn. Isolates from potatoes in Erzurum-Turkey. *Journal of Turkish Phytopatholoy*, 22:95-102**.**

Dijst,G. 1988. Formation of sclerotia by *Rhizoctonia solani* on artificial media and potato tubers. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **94**: 233-242.

Dijst, G. 1990. Effect of volatiles and unstable exudates from underground potato plant parts on sclerotia formation by *Rhizoctonia solani* before and after haulm destruction. *The Netherlands Journal of Plant Pathology*, 96:155-170.

Doornik, A.W. 1980. Some factors affecting the parasitic and saprophytic activity of *Rhizoctonia solani*. *Acta Horticulturae*, 109:387-394.

Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson T. H. 1980. Compendium of Soil Fungi. pp 765- 771. Academic Press. London.

Duffy, B. 2000. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorecens* strain 2-79 for integrated control of Rhizoctonia root rot and take-all of spring wheat. *Crop Protection*, 19:21-25.

Duveiller, E., Fucikovsky, L. & Rudolph, K. 1997. The Bacterial Diseases of Wheat : Concepts and Methods of Disease Management .Mexico,D.F.: CIMMYT. 78PP.

Eken, C. & Demirci, E. 2004. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, *Turkish Journal of Plant Pathology*, 86:49-52.

EL-Habbaa, G. M., Felaifel, M. S., Zahra, A. M. & Abdel- Ghany, R. E. 2002. *In vitro* evaluation of some fungicides, commercial biocontrol formulations and natural plant extracts on peanut root-rot pathogens *Egyptian Journal of Agricultural Research*,. 80: 1017-1030

Erlich, H. A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY.

Erschadi, S., Haberer, G., Schoniger, M., TorresRuiz, R.A. 2000. Estimating genetic diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Theoretical and Applied Genetics,* 100: 633- 640.

Flachowsky, H., Schumann, E., Weber, W. E. & Peil, A. 2001. Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding,* 120: 305-309.

Flentje, N. T. & Sakesena, H. 1957. Studies on *Pellicularia filamentosa* (Pat) Rogers.II. Occurrence and distribution of pathogenic strains. *Transactions of the British Mycological Society,* 40: 95-108.

Fokkema, N. J. 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. pages 487-506. In: *Microbiology of aerial plantsurfaces,.* Dickinson, C.H.& Preece, T.F. (eds.) Academic Press, London.

Fouly, H. M., Pedersen, W. L., Wilkinson, H. T. & El-Kader, M. M. A. 1996. Wheat root rotting fungi in the "old" and "new" agricultural lands of Egypt. *Plant Disease,* 80: 1298-1300.

Frank, J.A. 1978. The *Rhizoctonia* canker (black scurf). In: Hooker, W.J (ed.). Compendium of potato diseases. APS Press. pp. 52-54.

Gonzalez, D., Carling, D. E., Kuninaga, S., Vilgalys, R. & Cubeta, M. A. 2001. Ribosomal DNA systematic of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs.*Mycologia,*93:1138-1150.

Grosch, R., Faltin, F., Lottmann, J., Kofoet, A. & Berg, G. 2005. Effectiveness of three antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. *Canadin Journal Microbiology,*51**:** 345–353.

Grosch, R.& Kofoet, A., 2003. Influence of temperature, pH and inoculum density on bottom rot on lettuce caused by*Rhizoctonia solani. Journal of Plant Diseases and Protection,* 110: 366-378.

Grosch, R., Schneider, J. H. M., Kofoet, A. 2004. Characterization of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. *European Journal of Plant Pathology*,. 110: 53–62.

Hamming, R. W. 1950. Error detecting and error correcting codes. *Bell System Technical Journal*, 29 (2): 147-160.

Hide, G. A., Read, P. J., Frimager, J. P. & Hall, S. M. 1989. Stem canker (*Rhizoctonia solani*) on five early and seven main crop potato cultivars. II. Effects on growth and yield. *American Applied Biology*, 114: 267-277.

Hide, G. A. & Frimager, J. P. 1990. Effect of an isolate of *Rhizoctonia solani* Kühn.AG8 from diseased barley on the growth and infection of potatoes (*Solanum tuberosum*). *Potato Research*, 33: 229-234.

Hill, C. B. & Anderson, N. A. 1989. An evaluation of potato disease caused by isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3. *American Potato Journal,* 66: 709–21.

Hodgosn, W. A., Pond, D. D. & Munro, J. 1974. Diseases and Pests of Potatoes. Pub. Department of Agriculture Canada. No, 1492. 64 pp.

Holt-Harris, J. E. & Teague, O. 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. *The International.Journal of. Infectious. Diseases,*. 18:596–600.

Homma, Y., Yamashita, Y. & Ishii, M. 1983. A new anastomosis group (Ag-7) of *Rhizoctonia solani* Kühn from Japanese radish fields. *Phytopathological Society of Japan*, 51: 372-373.

Hooker, W.J. 1981. Compendium of potato diseases. APS Press. 125 p.

Jaaffar, A.M., Weller, D.M., Paulitz, T.C.& Thomashow, L.S. 2010. Effect of pH on the growth of *Rhizoctonia* spp. from cereal-based cropping systems in eastern Washington State. *Phytopathology*, Vol. 100, No.6,pg. S85.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles rescherches sur la distribution florale. Bulletin. Soc. Vuadoise des Sciences Naturelles. 44:223-270.

Jalaluddin, M. &Anwar, Q.M.K. 1989. Reaction of wheat varieties to foot rot and root rot disease of wheat in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 21: 191-194.

Jeger, M.J., Hide, G.A., van den boogert, P. H. J. F., Termorshuizen, A.J.& van Baarlen, P. 1996. Soil-borne fungal pathogen of potato. *Potato Research*, 39: 437-469.

Johnson, S. B. & Leach, S. S. 2008. Rhizoctonia Diseases on Potatoes.University of Maine Cooperative Extension Bulletin-2273.

Justesen, A. F., Yohalem, D., Bay, A. & Nicolaisen, M.2003. Genetic diversity in potato field population of *Thanatephorus cucumeris* AG3, revealed by ITS Polymorphism and RAPD Markers. *Mycological Research*,.107:1323-1331.

Kasem, K. K., Sabet, K. K.,Omar, M. R., Asran, A. A. & Mikhail, M. S. 2010. Current *Rhizoctonia solani* anastomosis groups in Egypt and their pathogenic relation to cotton seedlings. *African Journal of Microbiology Research*,. 4(5), pp. 386-395.,

Kataria, H. R., Hogelshofer, U. & Gisi, U. 1991. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Plant Pathology*, 40: 203-211.

Kliebenstein, D. J., Gershenzon, J.& Mitchell-Olds,T. 2001. Comparative quatitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds.*Genetics*, 159: 359-370.

Kotila, J. E. 1929. A study of biology of new species forming *Rhizoctonia*,*Corticum praticola. Phytopathology*, 19: 1059-1099.

Kozol, A. J., Traniello, J. F. A. & Williams, S. M. 1994. Genetic varaition in the endangered burying beetle *Nicrophorus americanus* (Coleoptera: Silphidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87:928-935.

Kucharek, T. 2000. *Rhizoctonia* diseases in aboveground plant parts of agronomic and vegetable crops. Plant Pathology Fact Sheet, PP-41. Florida Cooperative Extension Service.

Kulik, M. M. & Dery, P. D.1995. Frequency of plant in population of annual and perennial medics (*Medicago* spp) that were resistant to damping off incited by AG4 isolates of *Rhizoctonia solani. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*,.102:392-398.

Kuninaga, S., Carling, D. E., Takeuchi, T. &Yokosawa, R. 2000. Comparison of rDNA-ITS sequences between potato and tobacco strains of *Rhizoctonia solani* AG3. *Journal of General Plant Pathology*, 66: 2-11.

Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current.Genetic*,.32: 237-243.

Kuninaga, S., Yokosawa, R. & Ogoshi, A. 1978. Anastomosis groupings of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from non-cultivated soils. Annals of the *Phytopathological Society of Japan*, 44: 591-598.

Lahlali, R. & Hijri, M. 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *Federation of European Microbiological Societies*. Published by Blackwell Publishing Ltd.. (*FEMS Microbiol Lett*.), 311(2):152-9.

Laroche, J. P., Jabaji-Hare, S. H. & Charest, P. M. 1992. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology*, 82**:**1387-1392.

Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D.& Gelfand, D. H., 1993. "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity". *PCR Methods Appl.***2**: 275-287. PMID 8324500.

Leach, S. S. & Clapham, W. M. 1992. *Rhizoctonia solani*. on white lupine. *Plant Disease* 76: 417-419.

Lee, J., Bricker, T. M., Lefevre, M., Pinson, S. R. M. & Oard, J. H. 2006. Proteomic and genetic approaches to identifying defence related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant Pathology*,7:405-416.

Lehtonen, M. J. 2009. *Rhizoctonia solani* as a potato pathogen
- variation of isolates in finland and host response. http://ethesis.helsinki.fi

Lehtonen, M. J., Ahvenniemi, P, Wilson, P. S., German- Kinnari, M. & Volkonen, J. P. T. 2008. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* AG3 in a northern potato-cultivation environment in Finland.Plant Pathology, 57: 141-151.

Levine, M. 1918. Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. *The International. Journal of. Infectious. Diseases*,. 23:43–47.

Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1987. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathology*,. 36,438–446.

Liu, Z. L. & J. B. Sinclair. 1987. *Bacillus subtilis* as a potential biological control agent for Rhizoctonia root rot of soybean. *Phytopathology*, 77: 1687 (Abstract).

Lynch, J. M. 1990. Fungi as antagonists. In: R. R. Baker, P. E. Dunn (eds.) New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases, pp. 243–253. Alan R. Liss, New York.

Mackey & Sandys. 1965. *British. Medical. Journal*. *2*:1286

MacNish, G. C., Carling, D.E., Sweetingham, M. W., Ogoshi, A. & Brainard, K .A. 1995. Characterisation of Anastomosis Group-10 (AG-10) of *Rhizoctonia solani*. *Australasian Plant Pathology,* 24: 252-260.

Martin, S.B., Lucas, T. L & Campell, C. L. 1984. Comparative sensitivity of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like fungi to selected fungicides *in vitro*. *Phytopathology*, 74: 778-781.

Mathieson, J. T. & Rush, C. M. 1991. Influence of temperature and five fungicide on Rhizoctonia root rot of hard red winter wheat. *Plant Disease* 75: 983-986.

Meyer, L.,Wehner, F. C., Nel, L. H. & Carling, D. E.,1998. Characterization of the crater diseases strain of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology,* 88: 366-371.

Morgante, M. & Olivieri, A. M. 1993. PCR- amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal,* 3: 175-182.

Mohammed, A. S., El-Hassan, S.M., Elballa, M. M. A. & Elsheikh, E. A. E. 2008. The Role of *Trichoderma*, VA Mycorrhiza and Dry Yeast in the Control of Rhizoctonia Disease of Potato (*Solanum tuberosum* L.)**.** *Journal of. Agricultural Sciences*, 16(2): 285-301.

Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia, Ceratorhiza*,gen.nov.,*Epulorhiza,*gen.nov.,*Moniliopsis* and *Rhizoctonia. Mycotaxon*,29:91-99.

Moussa, T,A.A. 2002. Studies on biological control of sugarbeet pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn.*Journal of Biology Science*s,. 2(12): 800-804.

Mueller, U. G. & Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* **14**: 389-394.

Muis, A., Quimio, A. J. 2006. Biological control of banded leaf and sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) in corn with formulated *Bacillus subtilis* BR23. *Indonesian Journal of Agricultural science*,.7(1):2006:1-7.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 437 -497.

Mwang'Ombe, A. W., Thiong'O, G., Olubayo, F. M. & Kiprop, E. K. 2007. DNA microsatellite analysis of Kenyan isolates of *Rhizoctonia solani* from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Pathology Journal*,6(1):66-71

Nachit, M. M., Elouafi, I., Pagnotha, M. A., Elsdsaleh, A., Iacono, E., Labhilili, M., Asbati, A., Azrak, M., Hazzam, H., Benscher, D., Khairaallah, M., Ribaut, J. M., Tanzarella, O. A., Porceddu, E. & Sorrells, M. E. 2001. Molecular linkage map for an *intraspecific* recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L.var. *durum*). *Theoretical and Applied Genetics*,.102:177-186.

Nasim, G., Shah, T& Zahoor, R. 1996. Vesicular arbuscular mycorrhiza as a deterrent to pathogenic infections caused by *Rhizoctonia solani* in potato. *Scientific Khyber*,9:63-70.

Neate, S. M. & Warcup, J. H. 1985. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from Agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 85: 615-620.

Ogoshi, A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. *Review of Plant Protection Research*, 8: 93-103.

Ogoshi, A. 1984. Studies on the taxonomy of the genus *Rhizoctonia*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan,* 50: 307-309.

Ogoshi,A.1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual.Review of.Phytopathology*, 25:125-143.

Ogoshi, A., Cook, R. J. & Bassett, E. N. 1990. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80:784-788.

Olmos, L. K., Delgado, H. S. & Perez, M. N. 2005. AFLP fingerprinting for identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopathologia*, 23:147-151.

Otrysko, B. E., Banville, G. J & Asselin, A. 1985. Anastomosis group Identification and Pthogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from tuber-borne sclerotia. *Phytoprotetion*,.66:17-23.

Otrysko, B. E. & Banville, G. J. 1992. Effect of infection by *Rhizoctonia solani* on the quality of tubers for processing. *American Potato Journal*, 69: 645-652.

Papavizas, G. C.1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol.*Annual Review of Phytopathology*, 23:23-54.

Papavizas, G. C. 1992. Biological control of selected soilborne plant pathogens with *Trichoderma* and *Gliocladium.* In: Tjamos, E. C., Papavizas, G. C., Cook, R.J. (eds.): Biological Control of Plant Diseases – Progress and Challenges for the Future, pp. 223–241. Plenum Press, New York

Parmeter, J. R. J. r., Sherwood, R. T. & Platt, W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, 59: 1270-1278.

Parmeter, J. R. & Whitney, H. S. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In *'Rhizoctonia solani*": Biology and Pathology. Parameter, J.R Junior (ed.). pp 7-19.

Pascual, C. B.,Toda, T., Raymondo, A. D.&Hyakumachi, M. 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of*'Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology*, 49:108-118.

Platt, H. W., Canal, F. & Gimenez, G. 1993. Effect of tuber-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* and fungicidal potato seed treatment on plant growth and Rhizoctonia disease in Canada and Uruguay. *American Potato Journal*, 70: 533-

Powelson, M. L., Johnson, K. B. & Rowe, R. C. 1993. Management of diseases caused by soil-borne pathogens. In: Rowe, R.C. (ed.) Potato Health Management. APS Press. pp. 149-158.

Promega Co. 1994. DNA silver staining system. Technical Manual. Part No. TMD 005. Madison, USA.

Rasochova, M. 1983. Current state and outlook of the potato variety collection from standpoint of large scale production requirement. *Rostlinna Vyroba,*, 23: 165-175.

Rauf, C. A., Ahmad, I. & Ashraf, M. 2007. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates from potato in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany,* 39(4): 1335-1340.

Read, P. J., Hide, G. A., Frimager, J. P. & Hall, S. M. 1989. Growth and yield of potatoes as affected by severity of stem canker (*Rhizoctonia solani*). *Potato Research*, 32: 9–15.

Ritchie, F., Bain, R. A. &McQuiLKen, M. P. 2009. Effects of nutrient status, temperature and pH on mycelial growth, sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani* from Potato. *Journal of Plant Pathology*, 91 (3): 589-596.

Ritchie, F., McQuilken, M. P., Bain, R. A.2006. Effects of water potential on mycelial growth, sclerotial production, and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. *Mycological Research,* 110: 725-733.

Roberts, D. P., Lohrke, S. M., Meyer, S. L. F., Buyer, J. S., Bowers, J. H., Souza, J. T., Lewis, J. A., Chung, S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soil-borne diseases of cucumber. *Crop Protection*, 24: 141-155.

Robichaux, R. H., Friar, E. A. & Mount, D. W. 1997. Molecular genetic consequences of a population bottleneck associated with reintroduction of the Mauna Kea silversword (*Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* [Asteracease]). *Conservation Biology*, 11:1140-1146.

Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate system (v.2.1). User guide. *Exeter Software, Setauket, New York.*

Rubio, V., Tavantzis, S.M., Lakshman, D.K. 1996. Extrachromosomal elements and degree of pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. In. Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Eds. SnehB, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 127-138.

Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. 1984. Ribosomal spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance,

chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the. National. Accademy of. Sciences*, 83:1757–1761.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. &. Maniatis, J. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanders, P. L., Burpee, L. L & Cole, H. 1978. Preliminary studies on binucleate turfgrass pathogens that resemble *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 68: 145-148.

Savelyeva, N. M. & Maystrenko, O. I. 1983. Inheritance of resistance to root rot in spring wheat. I. Monosomic genetic analysis of the variety *Skala. Genetika* USSR.19: 1668-1673.

Schultz, H. 1936. Vergleichende Untersuchungen zur Oekologies, Morphologie, und Systematik der "Vermehrungspilzen" *Arb. Biol. Reichanst. Land und Forstwirtsch*. Berlin 22: 1-41.

Shahrokhi, S., Shahidi Bonjar, G. H. & Saadoun, I. 2005. Biological control of potato isolate of *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces olivaceus* Strain 115. *Biotechnology*, 4(2):132-138.

Sharkey, D.J., Scalice, E.R., Christy, K.G., Atwood, S. M. & Daiss, J. L. 1994. "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Biotechnology*, 12: 506-509.

Sharon, M. H., Read, P. J., Hide, G. A.& Frimager, J. P.1989. Growth and yield of potatoes as affected by severity of stem canker (*Rhizoctonia solani*). *Potato Research*, 32: 9-15.

Shew, H. D., Lucas, G. B. 1991. Compendium of tobacco diseases. St.Paul, MN: *American Phytopathological Society*.

Shew, H. D., Melton, T. A. 1995. Target spot of tobacco.*Plant Disease.*79:6-11.

Smiley, R. W.& Uddin, W. 1993. Influence of soil temperature on *Rhizoctonia* root rot (*R. solani*AG8 and *R.oryzae*) of winter wheat .*Phytopathology*,83: 777-785.

Smulders, M. J. M., Bredemeijer, G., Ruskortekaas, w., Arens, P. & Vosman, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and .Applied.Genetics*,.97: 264-272.

Sneh, B., Burpee, L. & Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathological Society. St. Paul. MN. USA.

Spooner, D., Van Treuren, R. & De Vicente, M. C. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy.

Stevens Johnk, J., Jones, R. K., Shew, H. D. & Carling, D. E. 1993. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG3 from potato and tobacco. *Phytopathology*, 83: 854-858.

Sumner, D. R. 1987. Efficacy of pencycuron against isolates representing different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like binucleate fungi. *Plant Disease*, 71: 515-518.

Talbot, P. H. B. 1970. Taxonomy, nomenclature of the perfect state. In: *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. Parameter, J.R. Jr (ed) pp: 20-31.

Truter, M., Wehner, F. C 2004 . Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf and stem canker of potato in South Africa. *Plant Disease,* 88: 83.

Tschen, J. S. M. 1987. Control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*.*Transaction of the Mycological Society of Japan,* 28: 483-493

Tsror, L. 2010. Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato. *Phytopathology*,.158(10): 649-658.

Tsror (Lahkim), L., Livescu, L., Hazanovski, M., Erlich, O., Aharon, M., Barak, R., Peretz, I., Bing, B & Yaniv, A. 1996. Control of black scurf in potatoes. *Phytoparasitica*, 24:152.

Tsror (Lahkim), L.& Peretz-Alion, I. 2005. The influence of inoculum source of *Rhizoctonia solani* on development of black scurf on potato. *Phytopathology*, 153: 240-244.

Tu, C. C. & Kimborough, J. W. 1978. Systematic and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. *Botanical Gazette* 139: 454-466.

Ueyama, I., Araki, Y., Kurogochi, S., Yoneyama, K. & Yamaguchi, I. 1990. Mode of action of the phenylurea fungicide pencycuron in *Rhizoctonia solani*. *Pesticide Science*, 30: 363-365.

Van den Boogert, P. H. J. F. & Velvis, H. 1992. Population dynamics of themycoparasite *Verticillium biguttatum* and its host *Rhizoctonia solani. Soil Biology &. Biochemistry*,. 24: 157-164.

Van Der ZAAG, D. E. 1991. The Potato Crop in Saudi Arabia. 206 p.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y.& Valéro, J. R. 2007. Antagonistic fungi, *Thrichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*,37:1-20.

Vilgalys, R.& Cubeta, M. A. 1994. Molecular systematic and population biology of *Rhizoctonia. Annual Review of phytopathology*, 32:135-155.

Vincell,P. C.& Herr, J. J. 1992. Two diseases of alfalfa caused by *Rhizoctonia solani* AG1 and AG4.*Plant Disease*, 76:1883.

Virgen-Calleros, G., Olade-Portugal, V. & Carling, D. E. 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in Central Mexico and potential for biological and chemical control. *Journal of Potato Research*, 77: 219-224.

Vos, P. & Kuiper, M. 1997. AFLP analysis,in *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews* (Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P.M., eds), pp. 115–131, Wiley.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M.1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research,*.23:4407-4414.

Weinhold, A. R., Browman, T. & Hall, D. H. 1978. *Rhizoctonia* disease of potato in California. *American Potato Journal*, 55: 56-57.

Wessels, P. G. W. 2001. Soil nitrogen dynamics and spring wheat (*T. aestivum*) production in different cropping systems in the Swartland. M.Sc. thesis,University of Stellenbosch, Stellenbosch.

Wharton, P., Kirk, W., Berry, D. & Snapp, S. 2007. Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato.Michigan State University, Extension Bulletin E- 2994.

Wicks, T. J., Morgan, B. & Hall, B. 1995. Chemical and biological control of *Rhizoctonia solani* on potato seed tubers. *Australian Journal of Experimental Agriculture,* 35: 661-664.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research,*18:6531–6535.

Wilson, P. S., Ahvenniemi, P. M., Lehtonen, M. J., Kukkonen, M., Rita, H. & Valkonen, J. P. T. 2008b. Biological and chemical control and their combined use to control different stages of of the *Rhizoctonia* disease complex on potato through the growing season.. *Annals of Applied Biology,*.153:307-320.

Wilson, P. S., Ketola, E. O., Ahvenniemi, P. M., Lehtonen, M,J. & Valkonen, J. P. T. 2008a. Dynamics of soil-borne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Thrichoderma harzianum*: effect on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. *Plant Pathology,* 57:152-161.

Woodhall, J. W., Less, A. k., Edwards, S. G. & Jenkinson, P. 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology,* 56: 268-295.

Woodhall, J. W., Less, A. k., Edwards, S. G. & Jenkinson, P.2008. Infection of potato by *Rhizoctonia solani*: effect of anastomosis group. *Plant Pathology*,57: 897-905.

Yanar, Y., Yilmaz, G., Cosmeli, I. & Coskun, S. 2005. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates from Potatoes in Turkey and Screening Potato Cultivars for Resistance to AG-3 Isolates. *Phytoparasitica*, 33: 370-376.

Yao, M. K., Tweddell, R. J. & Desilets, H. 2002. Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza*, 12: 235-242.

YU, G. Y., Sinctair, J. B., Hartman, G. L. & Bertagnolli, B. L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biology andBiochemistry, 34:955-963.

Zakria, M., Rauf, C. A., Minhas, N. M., Khan, M. S. A. 2002. Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from potato. Integrated Plant Disease Management. Proceedings of 3rd National Conference of Plant Pathology, NARC, Islamabad, Pakistan pp. 90-93.

Zabeau, M.& Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplication: A general method for DNA fingerprinting. European .Patent Application,Publ. No..0534858A1.

الملخص العربي

تعد البطاطا/البطاطس أحد المحاصيل الغذائية والصناعية المهمة في كافة انحاء العالم. تصاب البطاطا في سورية بعديد من الأمراض الفطرية، ويعد الفطر *Rhizoctonia solani* Kühn (الطور الجنسي *Thanatephorus cucumeris* Donk) من أهم الممرضات التي تترافق مع زراعة البطاطا إذ يسبب مرض القشرة السوداء والتقرح التاجي. يقسم *R. solani*، بالارتكاز على التردّد النسبي لعدد نقاط انصهار الهيفات، إلى مجموعات تشابكية Anastomosis Groups (AGs). هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد الأهمية النسبية للمرض على البطاطا في العروتين الربيعية والخريفية، تحديد المجموعات التشابكية للممرض في سورية، تأثير عدد من الأحياء التضادية البكتيرية والفطرية وكذلك المبيد الكيميائي تولكولفس ميثيل، وتوليفة من العوامل السابقة في مكافحة المرض تحت الظروف المخبرية وظروف الدفيئة البلاستيكية.

أظهرت نتائج المسح الحقلي انتشار مرض القشرة السوداء والتقرح التاجي في معظم مناطق زراعة البطاطا، حيث بلغ متوسط نسبة الإصابة بالمرض خلال العروة الخريفية 60.46%، وكانت أعلى نسبة للإصابة في محافظات إدلب وحلب وحماه، ولم تسجل أية إصابة في محافظة الحسكة (القامشلي). وكانت نسبة الإصابة في العروة الربيعية أعلى منها في الخريفية بمتوسط نسبة إصابة 64.19%، وكانت أعلى نسبة للإصابة في هذه العروة في محافظة حلب. بين تحليل استمارة المسح الحقلي أن الإصابة بالممرض المدروس تعود لأسباب عديدة منها: زراعة درنات ملوثة بمرض القشرة السوداء، وزراعة صنف قابل للإصابة، وطبيعة التربة، وعدم اتباع دورة زراعية. تم الحصول على 55 عزلة من الفطر *R. solani* تبعاً لخصائصها المورفولوجية. وأظهرت نتائج اختبار القدرة الإمراضية وتطبيق فرضيات كوخ أن جميع هذه العزلات كانت ذات قدرة إمراضية على الصنف القابل للإصابة (بينيلا). كما تبيّن، اعتماداً على طريقة تشابك الهيفات، انتماء 47 عزلة (85.45 %) للمجموعة التشابكية AG3، في حين انتمت عزلة واحدة فقط (1.81 %) للمجموعة AG-1، ولم نتمكن من تحديد هوية سبع عزلات (12.72%). ولم يكن لتوزع العزلات صلة بمنشئها الجغرافي.

لم تمكننا تقنية SSR من التمييز بين العزلات السورية ، نظراً لأنها أعطت جميعها حزماً أحادية الشكل Monomorphic. في حين أسهم استخدام تقانة AFLP في تحديد هوية عزلات *R. solani* التي تم جمعها من حقول البطاطا ومعرفة المجموعة التشابكية التي تنتمي إليها . فقد أظهرت النتائج انتماء معظم العزلات للمجموعة التشابكية AG3، بالإضافة لمجموعات تشابكية أخرى. وجاءت نتائج الدراسة الجزيئية مؤيدة لنتائج تشابك الهيفا، باستثناء عزلة صوران التي انتمت للمجموعة AG-1

اعتماداً على تشابك الهيفا. علماً أنه، باستخدام التوليفتين المستخدمتين في هذا البحث، كانت نسبة التشابه بين عزلة صوران والمجموعة AG-1 أكثر من 80% وكانت أقرب لهذه المجموعة من المجموعات التشابكية الأخرى. وبالنسبة للعزلات التابعة للمجموعة AG3، وجد اعتماداً على تقانة AFLP أن هناك تبايناً في نسب التشابه فيما بينها، وهذه النتيجة مؤيدة لنتائج تشابك الهيفا حيث كانت العزلات التي تنتمي لـــ AG3 تأخذ النمطين C2، C3.

مكنت الدراسة، باستخدام جهاز بيولوغ BIOLOG من تحديد هوية 7 عزلات بكتيرية، تم جمعها من جو جذور نباتات البطاطا من مناطق زراعتها في سورية، وتبين أنها تنتمي للنوع *Bacillus subtilis* وأنها تتسم بقدرة تضادية جيدة، حيث تراوحت نسبة التضاد مع الفطر المدروس ما بين 53−68%.

أخرت عزلة شرسة من ترايكودرما من نمو فطر *R. solani* في تجربة المقابلة، في حين لم يكن للفطر التضادي التأثير نفسه في الفطر التابع للمجموعة AG3، عندما وضع طبق الفطر فوق طبق مستعمرة الترايكودرما. مما قد يشير إلى أن المادة 6-pentyl-alpha-pyrone (6PAP) التي ينتجها الفطر التضادي لم تؤثر في الفطر الممرض المستهدف أو أن نوع الترايكودرما المستخدم لا ينتجها.

منع تطبيق المبيد tolclofos methyl على عزلات المجموعة AG3 من ظهور مرض القشرة السوداء على الدرنات الناتجة، وهذا مؤشر جيد للحصول على درنات نظيفة. ووجد أنه كلما زاد تركيز المبيد قلت مساحة التقرحات على التاج والمدادات التي تحدثها كل من AG3، AG3P، AG3R.

وجد أن لإضافة الفطر *Trichoderma* sp. دورفي زيادة وزن الدرنات بوجود المجموعتين AG3R، AG3، في حين لم يؤثر الفطر التضادي في خفض وزن الدرنات بوحود المجموعة AG3P، ويعزى السبب في ذلك إلى أن AG3P هي العزلة الأشرس والمتخصصة على البطاطا. وربما يعود سبب التأثّر الأكبر للمجموعة AG3R بالفطر التضادي إلى أن كليهما معزول من تربة سورية.

أدى إضافة عنصري المكافحة (الفطر *Trichoderma* والبكتيريا ***Bacillus subtilis***) معاً إلى عدم إصابة الدرنات الناتجة بمرض القشرة السوداء، وأسهما نوعاً ما في مكافحة التقرح التاجي بشكل أكثر فاعلية من المعاملة بكل منهما على حدا

أثبتت نتائج الدراسة أن هناك مدى واسع في قابلية أصناف البطاطا للإصابة بالفطر *R. solani*، وأنه لاتوجد أصناف في سورية مقاومة للفطر المذكور.

الملخص الإنكليزي

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food and industrial crops worldwide. In Syria, potato suffers from many fungal diseases, where *Rhizoctonia solani* Kühn. (teleomorph *Thanatephorus cucumeris* Donk.) is an important disease associated with potato cultivation. *R. solani* is divided into anastomosis groups (AGs) based on the relative frequency of hyphal fusion points. This study aims to determine the relative importance of the disease in both spring and autumn sowings, to identify the anastomosis groups of the pathogen in Syria, the effect of some fungal, bacterial antagonists and chemical fungicide, and a combination of the mentioned factors, on disease control under laboratory and green house conditions.

Field survey revealed the spread of black scarf disease and stem canker in almost all potato growing areas in the country. Disease incidence, in general, attained 60.46% with the highest disease incidence being recorded in Idlib, Aleppo and Hama provinces, and no disease was recorded in Kamishly (Hassakeh province). Disease incidence was higher in spring-sown (64.19%) as compared to autumn- sown and the highest disease incidence was recorded in Aleppo province. Analysis of survey sheet indicated that disease incidence correlated well with growing infected seed tubers, susceptible varieties, soil type and crop rotation. Fifty five isolates of *R.solani* were identified based on morphological characteristics. Pathogenicity tests showed that all isolates were pathogenic on cv "Benella". Two anastomosis groups (AGs) were identified: 47 isolates (85.45%) belonged to AG3, and only one isolate (1.81%) belonged to AG1, and 7 isolates (12.72 %) remained unidentified. There were no correlation between isolates and their geographical origin.

SSR was unable to differenciate between the isolates collected, which all give monomorphic bands. However, AFLP contributed to the determination of isolates identity. Results revealed that most isolates belonged to AG3 and some other AGs. This confirmed results of anastomosis technique. Similarity index of Souran isolate with AG1 was more than 80% and was nearer to this group more than other AGs. AFLP also revealed some variation in similarity index of AG3 isolates and this also confirm results of anastomosis technique where isolates anastomosis were of C2 and C3 types

BIOLOG enabled us to determine the identity of 7 antagonistic bacterial isolates, from potato rhizosphere collected from different growing regions in Syria. All 7 isolate belonged to *Bacillus subtilis* and exhibited good antagonistic activity (53-68%) against the pathogen studied (*R. solani*).

An aggressive isolate of *Trichoderma* retarded the growth of *R. solani* in the confrontation experiment, wheras the antagonistic fungus did not have similar effect on AG3 of the fungus when the fungus colony was put on *Trichoderma* Petri dish.

This might indicate that 6-pentyl-alpha-pyrone (6PAP) substance produced by the anagonist did not affect the pathogenic fungus or is not produced at all by the former.

Application of Tolcolfos methyl on AG3 isolates prevented the appearance of black scurf on potato tubers. It was found that necrotic areas on crown and stolons, which AG3 ‹AG3P ‹AG3R caused, were reduced with increasing concentrations of the fungicide

Trichoderma sp. played a role in increasing tubers' weight in presence of AG3 and AG3R. However, the same antagonist did not affect tubers' weight with AG3P. This might due to AG3P being the most virulent on potato and that the great interaction between AG3R and the antagonists to the fact that both were isolated from a Syrian soil

Adding both *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* prevented tubers infection with black scurf, and contributed both to the control of crown lesion better than applying them separately

The present study proved that there is a wide range of susceptibility of potato cultivars to *R. solani,* and that there is no Syrian potato cultivar resistant to the fungus.

الملحقات

ملحق رقم 1. الأوساط الغذائية

وسط بطاطا ديكستروز,آجار(PDA)

حضر بمزج 39 غ من مسحوق PDA الجاهز ويكمل الحجم إلى 1000 مل ماء مقطر، في دورق مخروطي سعة 2000 مل ماء. تخلط المحتويات جيداً على رجاج مغناطيسي، وتسد فوهة الدورق بقطن معقم، ويغلف القطن بورق ألمنيوم، ويعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند 121°س لمدة 20 دقيقة. يترك الوسط حتى يبرد (50–60 °س), ويصب في أطباق بتري ذات قطر 9 سم، بما يعادل 20 مل للطبق الواحد. حيث pH 5.6 ± 0.2.

Downes and Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
Marshall, (ed.). 1993. Standard methods for the examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

وسط الآجار المغذي Nutrient agar (NA)

حضر بمزج 23 غ من مسحوق الآجار المغذي (NA) الجاهز ويكمل الحجم إلى 1000 مل ماء مقطر, في دورق مخروطي سعة 2000 مل ماء. تخلط المحتويات جيداً على رجاج مغناطيسي, وتسد فوهة الدورق بقطن معقم، ويغلف القطن بورق ألمنيوم، وعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند 121°س لمدة 20 دقيقة يترك الوسط حتى يبرد (50–60°س), ويصب في أطباق بتري ذات قطر 9 سم، بما يعادل 20 مل للطبق الواحد. (Duveiller *et al.*,1997).

وسط المرق المغذي Nutrient broth (NB)

حضر بمزج 8 غ من مسحوق المرق المغذي (NB) الجاهز ويكمل الحجم إلى 1000 مل ماء مقطر, في دورق مخروطي سعة 2000 مل ماء. تخلط المحتويات جيداً على رجاج مغناطيسي، وتسد فوهة الدورق بقطن معقم، ويغلف القطن بورق ألمنيوم، وعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند 121°س لمدة 20 دقيقة (Duveiller *et al.*,1997).

وسط الآجار المائي Water Agar

يحضر بأخذ 15 غ من مسحوق الآجار ويكمل الحجم لـــ 1000 مل من الماء المقطر في دورق مخروطي سعة 2000 مل ماء، تخلط المحتويات جيداً على رجاج مغناطيسي, وتسد فوهة الدورق بقطن معقم، ويغلف القطن بورق ألمنيوم، وعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند °س لمدة

20 دقيقة. يترك الوسط حتى يبرد (50−60 °س)، ويصب في أطباق بتري ذات قطر 9 سم، بما يعادل 20 مل للطبق الواحد. Base (Papavizas & Davey, 1959; Lingappa & Lockwood, 1960).

الوسط المغذي المرتكز على الدم blood agarbase

يحضر بأخذ 40غ من مسحوق blood agar base ويكمل الحجم لـــ 1000 مل من الماء المقطر في دورق مخروطي سعة 2000 مل ماء، وسخن حتى يذوب بشكل جيد، وعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند 121°س لمدة 15 دقيقة، ثم برد حتى 45−50°س, ويضاف دم معقم مزال الفبرين.defibrinated blood بنسبة 6% (من 5−10%) يحفظ بعيداً عن الضوء المباشر, وفي حرارة أقل من 8°س.pH 7.3+/-0.2 (المرجع)

وسط Cystine Lactose –Electrolyte –Deficient CLED

حضر بمزج 36غ من مسحوق **CLED** الجاهز في 1 لتر ماء مقطر، وسخن حتى يذوب بشكل جيد، وعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند 121°س لمدة 15 دقيقة, pH الوسط 7.3 ± 0.2 (Mackey & Sandys, 1965).

وسط Eosin-methylene blue (EMB) agar

حضر بمزج 36غ من مسحوق EMB agar الجاهز في 1 لتر ماء مقطر، وسخن حتى يذوب بشكل جيد، وعقم الوسط بالأوتوغلاف (الحرارة الرطبة) عند 121°س لمدة 15 دقيقة, pH الوسط.7,2 (Holt-Harris & Teague, 1916; Levine, 1918).

ملحق رقم 2. المحاليل المستخدمة في الدراسة الجزيئية

2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction buffer:
1.4 M NaCl
0.1 M Tris-HCl, pH 8.0
20 mM EDTA
2% w/v CTAB
0.2% ß mercaptoethanol, pH 8.0

Washing buffer:
75% Ethanol, 25% dH2O

TE Buffer:
10 mM Tris-base
1 mM EDTA. pH 8.0

10X Agarose Loading Buffer:
0.25% Bromophenol blue
50% Glycerol
60 mM EDTA, pH 8.0

10 X PCR Buffer:
100 mM Tris-HCl, pH 8.4
500 mM KCl
15 mM $MgCl_2$
0.01 % gelatin

10X One Phor All Buffer:
100 mM Tris-acetate, pH 7.5
100 mM magnesium acetate
500 mM potassium acetate

Repele Silane:
2% solution of dimethyldichlorosilane in chloroform

Bind Silane Solution:
8 ml Ethanol
200 ml Galacial Acetic acid
10 µl Bind-Silane
1.8 ml Double distilled H2O

10% Ammonium persulfate:
0.5 g ammonium persulfate
5 ml dH_2O

10X TBE Buffer:
107.8 g Tris-base
7.44 g EDTA
55.0 g boric acid

STR 3X Loading Dye Solution:
10 mM NaOH
95 % formamide
0.05 % bromophenol blue
0.05 % xylene cyanol FF

Fix/Stop Solution (0% acetic acid):
200 ml glacial acetic acid
1800 ml dH_2O

Staining Solution:
2 g silver nitrate ($AgNo_3$)
3 ml 37% formaldehyde (H_2CO)
2000ml dH2O

Developer Solution:
60 g sodium carbonate, (anhydrous Na_2CO_3)
3 ml 37% formaldehyde (H2CO)
400µl 10mg/ml sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$.5H2O)
2000ml dH_2O

ملحق رقم 3. تحضير المحاليل الخاصة بزراعة نسج البطاطا

تحضير المحاليل الخاصة بزراعة نسج البطاطا			
المحلول الأم رقم 1			
المادة	**الوزن**	**الحجم 1000 مل**	**الحجم 2000 مل**
نترات الأمونيوم NH4NO3	غ	82.5	165
نترات البوتاسيوم KNO3	غ	95	190
فوسفات البوتاسيوم الحامضية KH2PO4	غ	8.5	17
المحلول الأم رقم 2			
المادة	**الوزن**	**الحجم 100 مل**	**الحجم 200 مل**
حمض البوريك H3Bo4	مغ	620	1240
كبريتات المنغنيز H2O,MnSO4	مغ	2230	4460
كبريتات الزنك 7H2O,ZnSO4	مغ	860	1720
موليبيدات الصوديوم Na2MoO4.2H2O	مغ	25	50
كبريتات النحاس CuSO4.5H2O	مغ	2.5	5
كلوريد الكوبالت CoCl2.6H2O	مغ	2.5	5
المحلول الأم رقم 3			
المادة	**الوزن**	**الحجم 100 مل**	**الحجم 200 مل**
كبريتات المغنيزيوم المائية MgSO4.7H2O	غ	37	74
المحلول الأم رقم 4			
المادة	**الوزن**	**الحجم 200 مل**	**الحجم 400 مل**
كلوريد الكالسيوم CaCl2.2H2O	غ	44	88
المحلول الأم رقم 5			
المادة	الوزن	الحجم 100 مل	الحجم 200 مل
يوديد البوتاسيوم KI	مغ	83	166
المحلول الأم رقم 6			
المادة	**الوزن**	**الحجم 100 مل**	**الحجم 200 مل**
حمض النيكوتين	مغ	50	100
بيرودوكسين هيدروكلورايد	مغ	50	100
تيامين هيدروكلورايد	مغ	10	20
غلايسين	مغ	200	400
اينوزيتول	غ	10	20
المحلول الأم رقم 7			
المادة	**الوزن**	**الحجم 100 مل**	
شلات الحديد والصوديوم NaFe-EDTA	مغ	860	

ملحق جدول 3

المحافظة	المنطقة	تاريخ الجمع	تاريخ العزل	المساحة	الكائن الممرض المعزول	ملاحظات
حلب / خريفي	اكسيبيه	03/10/2007	08/10/2007	حوالي 0.5 هـ	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	تربتها حمراء، مصدر البذار مورك class A
	شمال مارع	04/10/2007	09/10/2007	أقل من 0.5 هـ	bacteria (black leg)	معقد فطري وبكتيري
	تركمان بارح	04/10/2007	09/10/2007	1/2هكتار	*Rhizoctonia* spp& *Trichoderma* spp	غنى تربها ب *Trichoderma* spp
	وحشية	18/10/2007	18/10/2007	10هـ	*Rhizoctonia* spp	تربتها حمراء، ثقيلة ، تزرع كل عام بالبطاطا
	السفيرة	18/10/2007	18/10/2007		*Rhizoctonia* spp	
	كفر الورد	18/10/2007	18/10/2007	أقل من 0.5 هـ	*Rhizoctonia* spp	
	تل مالد	25/10/2007	25/10/2007	1/2هكتار	*Rhizoctonia* spp& *Trichoderma* spp	غنى تربها ب *Trichoderma* sppونسبة الإصابة لا يتجاوز 2%
	الحميدية	25/10/2007	25/10/2007		*Rhizoctonia* spp	
	كفر كلبين	29/10/2007	03/10/2007	1هـ	*Fusarium* spp	
	بحورته	31/10/2007	03/11/2007	1/2هكتار	*Rhizoctonia* spp	تربتها حمراء داكنة
	صوران	29/10/2007	03/11/2007	1/2هكتار	*Rhizoctonia* spp	
	صوران	29/10/2007	03/11/2007	1/2هكتار	*Fusarium* spp	
	سيجراز	29/10/2007	03/11/2007	أكثر من هكتارين	*Fusarium* spp &*Verticillium* spp	الحقل موبوء بالحامول
	فريرية	29/10/2007	03/11/2007		*Rhizoctonia* spp	
	فريرية	29/10/2007	03/11/2007		*Rhizoctonia* spp	
	مارع	29/10/2007	03/11/2007	أكثر من 3 هـ	*Fusarium* spp	
	فافين	29/10/2007	03/11/2007	هكتار1/2	*Fusarium* spp	
	فافين	29/10/2007	03/11/2007	هكتار1/2	*Fusarium* spp	
	تل حسين	17/12/2007	17/12/2007	هكتار1/2	*Rhizoctonia* spp	
حلب / ربيعي	تل حدية	23/05/2008	23/05/2008		*Rhizoctonia* spp	درنات أم والناتجة مصابة & تربتها منخفضة وغنية بالسماد العضوي
	تل حدية	23/05/2008	23/05/2008	أقل من 0.5 هـ	*Fusarium* spp	تربتها منخفضة وغنية بالسماد العضوي
	طرندة	17/06/2008	05/08/2008		*Rhizoctonia* spp	
	كفر أنطون	08/05/2008	08/05/2008	حوالي 2 هـ	*Rhizoctonia* spp	درنات أم والناتجة مصابة & تربتها منخفضة
	كفر جنة	01/05/2008	01/05/2008	هكتار1/2	*Fusarium* spp	
	ألجي	22/05/2008	22/05/2008	حوالي 1 هـ	*Fusarium* spp	
	ألجي	22/05/2008	22/05/2008	حوالي 1 هـ	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	
	طعانة	22/06/2008	05/08/2008		*Rhizoctonia* spp	
	أحرص	29/04/2008	29/04/2008	هكتار2.5	*Rhizoctonia* spp	وجود الأمراض الفيروسية بنسبة 70%
	أحرص	29/04/2008	29/04/2008	0.5	أمراض فيروسية	
	فريريه	28/05/2008	28/05/2008		*Rhizoctonia* spp	درنات أم والناتجة مصابة
	وحشية	29/04/2008	29/04/2008	حوالي 10 هكتارات	*Rhizoctonia* spp	وتزرع كل عام بالبطاطا
	عفرين	22/06/2008	22/06/2008	حوالي 1 هـ	*Rhizoctonia* spp	زرعت لأول مرة بالبطاطا

تل رفعت	29/04/2008	29/04/2008	1/2هكتار	*Rhizoctonia* spp	زرعت لأول مرة بالبطاطا & وجود أبو العيد ولم يلاحظ وجود المن أو إصابة فيروسية
تل رفعت	29/04/2008	29/04/2008		*Rhizoctonia* spp	
كوسنيا	23/05/2008	23/05/2008	15دونم	*Rhizoctonia* spp	وجود أبو العيد والمن بكميات هائلة
كوسنيا	23/05/2008	23/05/2008		*Rhizoctonia* spp	نسبة الاصابة 10%
تل خطرة	23/05/2008	23/05/2008			
مارع	19/05/2008	19/05/2008	8هكتار	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp& bacteria	وجود أمراض فيروسية & وجود لفحة متأخرة
مارع	19/05/2008	19/05/2008	لا يتجاوز 600 م	*Rhizoctonia* spp& black stem	وجود أمراض فيروسية
عين جارة	22/05/2008	23/05/2008		*Rhizoctonia* spp	مصدر البذار ترمانين، درنات الأم والناتجة مصابة مزروعة لأول مرة بالبطاطا
ديوان تحتاني	22/06/2008	05/08/2008	5دونم	*Rhizoctonia* spp	تربتها منخفضة ، وزرعت لأول مرة بالبطاطا
السموقة	22/06/2008	22/06/2008		*Rhizoctonia* spp	
كفركلبين	22/06/2008	22/06/2008		*Rhizoctonia* spp	
الساعد	22/06/2008	22/06/2008		*Rhizoctonia* spp	
حيلان	22/06/2008	22/06/2008		*Rhizoctonia* spp	درنات ناتجة مصابة
كفر ناصح بحورته	29/04/2008	29/04/2008		*Rhizoctonia* spp	وجود أمراض فيروسية
ربيعي	29/04/2008	29/04/2008		*Rhizoctonia* spp	تربتها سوداء ثقيلة

المحافظة	المنطقة	تاريخ الجمع	تاريخ العزل	الكائن الممرض المعزول	الملاحظات
ادلب/ خريفي	سراقب	03/10/2007	09/10/2007	*Rhizoctonia* spp	ترب غنية بالنيماتودا
	سراقب	03/10/2007	09/10/2007	*Rhizoctonia* spp	ترب غنية بالنيماتودا
	أفس	03/10/2007	08/10/2007	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	ترب غنية بالنيماتودا& معقد مرضي
	أفس	03/10/2007	08/10/2007	*Fusarium* spp	ترب غنية بالنيماتودا& معقد مرضي
	طعوم	30/10/2007	03/11/2007	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	معقد مرضي
	شلخ	30/10/2007	03/11/2007	*Rhizoctonia* spp	لم يتم الحصول عليها بسبب عطل في الثلاجة
	تفتناز	30/10/2007	03/11/2007	*Fusarium* spp	معقد مرضي
	تفتناز	17/01/2008	17/01/2008	*Rhizoctonia* spp	ترب غنية بالنيماتودا
	بنش بش	30/10/2007	03/11/2007	*Fusarium* spp	
	مارون	30/10/2007	03/11/2007	*Fusarium* spp	منطقة منخفضة ، تربتها حمراء ثقيلة
	كتيان	30/10/2007	03/11/2007	*Rhizoctonia* spp	
إدلب/ ربيعي	كفريا	12/06/2008	12/06/2008	*Rhizoctonia* spp	ودرنات أم مصابة
	كفريا	12/06/2008	12/06/2008		

درنات أم والناتجة مصابة بالقشرة السوداء	*Rhizoctonia* spp	23/05/2008	21/05/2008	معارة
ودرنات أم مصابة	*Rhizoctonia* spp	23/05/2008	22/05/2008	جينه
		23/05/2008	22/05/2008	جينه
درنات أم والناتجة مصابة	*Rhizoctonia* spp	23/05/2008	22/05/2008	زردنا
تربتها منخفضة وغنية بالسماد العضوي، ومصابة بالمن		23/05/2008	22/05/2008	زردنا
درنات أم مصابة ونسبة إصابة بـــــ50% *Fusarium*	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	23/05/2008	21/05/2008	كفر حلب
نسبة إصابة بـــــ50% Fusarium spp، وجود الفئران	*Fusarium* spp	12/06/2008	12/06/2008	كفر حلب
	Fusarium spp	03/11/2007	30/10/2007	بنش
درنات أم والناتجة مصابة	*Rhizoctonia* spp	23/05/2008	22/05/2008	بنش
درنات أم والناتجة مصابة، مصابة باللفحة المتأخرة	*Rhizoctonia* spp	23/05/2008	22/05/2008	لوف
	Rhizoctonia spp	23/05/2008	21/05/2008	أتارب
درنات أم والناتجة مصابة، الري بالرزاز، منطقة جبلية بالإضافة إصابة الدرنات بالجرب	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	22/05/2008	22/05/2008	تل تونة
مصدر البذار نواتج فرز البطاطا	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp	22/05/2008	22/05/2008	كفر تعنور
درنات أم والناتجة مصابة	*Rhizoctonia* spp	22/05/2008	22/05/2008	كفر تعنور
وغنى تربها بالسماد البلدي	*Rhizoctonia* spp	22/06/2008	22/06/2008	ترمانين
	Fusarium spp	03/11/2007	30/10/2007	كتيان
درنات أم والناتجة مصابة	*Rhizoctonia* spp	23/05/2008	23/05/2008	كتيان

الملاحظات	الكائن الممرض المعزول	تاريخ العزل	تاريخ الجمع	المنطقة	المحافظة
منطقة مرتفعة وتربتها حمراء	*Fusarium* spp&bacteria	03/11/2007	02/11/2007	الهبيط	حماه/ خ
استخدم مبيد ريزولكس	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp&bacteria	03/11/2007	02/11/2007	كفرنبودة	
استخدم مبيد ريزولكس	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp&bacteria	03/11/2007	02/11/2007	كفرنبودة	
استخدم مبيد ريزولكس	*Rhizoctonia* spp & *Fusarium* spp&bacteria	03/11/2007	02/11/2007	كفرنبودة	
منطقة مرتفعة وتربتها حمراء	*Fusarium* spp	03/11/2007	02/11/2007	قلعة المضيق	
منطقة مرتفعة وتربتها حمراء	*Fusarium* spp	03/11/2007	02/11/2007	قلعة المضيق	
	Rhizoctonia spp & *Fusarium*	03/11/2007	02/11/2007	خان شيخون	
	Rhizoctonia spp & *Fusarium*	03/11/2007	02/11/2007	خان شيخون	
تربتها فقيرة حجرية، أمكن عزل بكتيريا مضادة للممرض المدروس	*Alternaria solani*	29/05/2008	22/08/2008	السمرة	حماه/ ر
تربتها حمراء، أمكن عزل بكتيريا مضادة للممرض المدروس	*Fusarium* spp	29/05/2008	22/08/2008	صوران جباريه	
تربتها حمراء، أمكن عزل بكتيريا مضادة للممرض المدروس	*Fusarium* spp	29/05/2008	22/08/2008	كوكب	

كفربهم	22/08/2008	29/05/2008	*Fusarium* spp
الخالدية	22/08/2008	29/05/2008	*Fusarium* spp
محردة	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
أشير	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
معرد فتين	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
ديمو	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
ديمو	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
السمرة	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
شيزر	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
تل سكندا	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
زلاقيات	29/07/2008	05/08/2008	*Fusarium* spp
كفرنبوده	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp
صفصافية	29/07/2008	05/08/2008	*Rhizoctonia* spp

المحافظة	تاريخ الجمع	تاريخ العزل	الكائن الممرض المعزول
درعا/ خ	03/10/2007	08/10/2007	*Rhizoctonia* spp
إزرع/ خ	03/10/2007	08/10/2007	*Rhizoctonia* spp
درعا / شقرا	15/07/2008	22/07/2008	*Rhizoctonia* spp
درعا / شقرا	15/07/2008	15/07/2008	*Rhizoctonia* spp
درعا /المحجة	15/07/2008	15/07/2008	*Rhizoctonia* spp
درعا / داعر	15/07/2008	15/07/2008	*Rhizoctonia* spp

المحافظة	المنطقة	تاريخ الجمع	تاريخ العزل	الكائن الممرض المعزول	الملاحظات
قامشلي / خريفي	خربة خليل	17/12/2007	19/ 12 /2007	*Fusarium* spp	غنى تربتها بالـــ *Trichoderma* spp
الحسكة / خريفي	تل حميس /تل طيب	17/12/2007	19/ 12 /2007	*Fusarium* spp	غنى تربتها بالـــ *Trichoderma* spp
الحسكة / خريفي	تل حميس/ تل سطيح	17/12/2007	19/ 12 /2007	*Fusarium* spp	غنى تربتها بالـــ *Trichoderma* spp
الحسكة /ربيعي		01/05/2008	01/05/2008	*Fusarium* spp	
الحسكة /ربيعي		01/05/2008	01/05/2008	*Fusarium* spp	

ملحق رقم 5. جدول المصطلحات

Anastomosis group	مجموعة تشابكية
Black Scurf	القشرة السوداء
Sclerotia	أجسام حجرية
Septum	حاجز عرضي
cellular nuclear number(CNN)	عدد النوى في الخلية
Clap connection	وصلات مقبضية
Rhizomorph	جدائل هيفية
Binucleate	ثنائي النوى
Multinucleate	متعدد النوى
Somatic incompatibility	عدم توافق جسدي
Loci	مواقع وراثية
mycorrizal	الفطور الجذرية
sprouts	براعم
Appresorium/infection cushion	وسادة الاختراق/ الالتصاق
Extracellular enzymes	الأنزيمات الخارجية
Chemical desiccant	المجففات الكيميائية
Daughter tubers	الدرنات البنت
Damping- off	الذبول المفاجئ
Aerial tubers	الدرنات الهوائية
Stunting	التقزم
Rosetting	التورد
No top	انعدام القمة
Desprouted tubers	الدرنات غير النبوته
Chisel plowing	المحراث الحفار
Mycoparasites	طفيليات الفطور
Biofumigation	التبخير الحيوي
Cover crop	محصول التغطية
Arbuscular Mycorrhizal Fungi AMF	الفطور الجذرية الشجيرية
DNA Pellet	كرية DNA
Thermocycler	جهاز التدوير الحراري
Bovine Serum albumin	مصل ألبومين بقري
Eosin methylene blue -Agar (EMB)	وسط إيوزين أزرق ميثيلين آجار (وسط انتخابي للبكتيريا السالبة الغرام)
Cystine Lactose-Electrolyte-Deficient CLED	وسط انتخابي لبكتيريا موجبة الغرام
Fluffy	رقيق/قطني
Sectoring	قطاعات

ملحق رقم 6. العزلات البكتيرية المعزولة من العينات الترابية

العزلات المعزولة في 11/3/08

صوران(حلب):

1. مستعمرة بيضاء لامعة محدبة حليبية قطرها 5 مم.
2. مستعمرة بيضاء لامعة محدبة حليبية قطرها 2 مم.
3. مستعمرة بيضاء ذات نقطة مركزية شفافة المحيط قطرها 2 مم.

شلخ:

1. مستعمرة صفراء شاحبة مسطحة لامعة قطرها 3 مم.
2. مستعمرة صفراء شاحبة محدبة لامعة قطرها 2 مم.

سراقب (بينيلا):

1. مستعمرة بيضاء لامعة محدبة حليبية قطرها 5 مم.
2. مستعمرة صفراء شاحبة محدبة لامعة قطرها 2 مم.
3. مستعمرة صفراء شاحبة مسطحة لامعة قطرها 3 مم.

العزلات المعزولة في 20/4/08

وحشية:

1. مستعمرة بيضاء ذات نقطة مركزية لامعة قطرها 5 مم.
2. مستعمرة صفراء شاحبة محدبة لامعة قطرها 2 مم.
3. مستعمرة بيضاء كريميه مسطحة لامعة قطرها 5 مم.
4. مستعمرة بيضاء شفافة ذات مركز كبير بلون بني فاتح غير لامعة مسطحة قطرها 4 مم.

سراقب (مارفونا):

1. مستعمرة بيضاء ذات نقطة مركزية لامعة قطرها 5 مم.
2. مستعمرة صفراء لامعة محدبة قطرها 2 مم.
3. مستعمرة بيضاء كريمية ذات نقطة مركزية لامعة قطرها 5 مم.

فريريه:

الصنف: بينيلا، المزارع: خير عبدالله

1. مستعمرة صفراء شاحبة ذات نقطة مركزية لامعة محدبة بلون بني فاتح قطرها 3 مم.
2. مستعمرة بيضاء شاحبة مسطحة لامعة قطرها 5 مم.

فريريه:

الصنف: بينيلا، المزارع:حسن الحسيني

1. مستعمرة بيضاء كريميه مسطحة لامعة قطرها 5 مم.
2. مستعمرة كريميه مسطحة لامعة قطرها 6 مم.
3. مستعمرة بيضاء كريميه ذات نقطة مركزية لامعة محدبة بلون بني فاتح قطرها 4 مم.

العزلات المعزولة في 17/8/08

تل تونة:

1. مستعمرة شفافة محدبة قطرها 6 مم.
2. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 8 مم.
3. مستعمرة حليبية محدبة قطرها1 مم.

جينه:

1. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 6 مم.
2. مستعمرة صفراء مسطحة قطرها 2 مم.
3. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 2 مم.

لوف:

1. مستعمرة صفراء باهتة محدبة قطرها 6 مم.
2. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 2 مم.
3. مستعمرة شفافة محدبة قطرها 6 مم.
4. مستعمرة بيضاء محدبة قطرها1 مم.
5. مستعمرة بيضاءذات حواف مشرشرة قطرها 11 مم.

كتيان:

1. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 9 مم.
2. مستعمرة صفراءمحدبة قطرها 2 مم.
3. مستعمرة شفافة منخمصة قطرها 3 مم.
4. مستعمرة صفراء محدبة قطرها1 مم.

لدى تحضين العزلات البكتيرية لكل من المناطق المذكورة عند 27±2ºس و22±2º س لمدة أسبوع لم يظهر التضاد بين العزلات البكتيرية و الفطر *Rhizoctonia solani* .

العزلات المعزولة في 3/9/08

زردنا:

1. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 6 مم.
2. مستعمرة صفراء باهتة محدبة قطرها 6 مم.
3. مستعمرة بيضاء محدبة لامعة قطرها 3 مم.
4. مستعمرة صفراء محدبة قطرها1 مم.

أبين:

1. مستعمرة بيضاء محدبة ذات مركز أبيض قطرها 5 مم.
2. مستعمرة بيضاء محدبة لامعة قطرها 5 مم.
3. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 1 مم.
4. مستعمرة حليبية ذات جواف مسننة مسطحة قطرها 4 مم.

طعوم:

1. مستعمرة صفراء باهتة محدبة قطرها 2 مم.
2. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 4 مم.

عفرين:

1. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 5 مم.
2. مستعمرة صفراء باهتة محدبة قطرها. 5 مم
3. مستعمرة حليبية محدبة قطرها 2 مم.

لدى تحضين العزلات البكتيرية لكل من المناطق المذكورة عند 27±2°س و22±2° س لمدة أسبوع لم يظهر التضاد بين العزلات البكتيرية و الفطر *Rhizoctonia solani* .

العزلات المعزولة في 17/9/2008

مرعناز:

1. مستعمرة صفراء باهتة محدبة قطرها. 1.5 مم.
2. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها 5 مم.
3. مستعمرة بيضاء مسطحة شفافة غير لامعة في مركزها دائرة ذات حواف مسننة قطرها 8 مم.
4. مستعمرة مسطحة صفراء زغبية ذات حواف غير منتظمة قطرها 7 مم.
5. مستعمرة بيضاء زغبية في مركزها دائرة ذات حواف مسننة قطرها 5 مم.

كفرأنطون:

1. مستعمرة بيضاء ذات مركز دائري شعاعي شفاف قطرها 6 مم.
2. مستعمرة حليبية ذات مركز دائري ومرتفع عن المستعمرة المركز لامع المستعمرة غير لامعة قطرها 4 مم.
3. مستعمرة صفراء شفافة محدبة لامعة قطرها 1.5مم.

تل حسين:

1. مستعمرة صفراء محدبة لامعة قطرها 3 مم.
2. مستعمرة بيضاء ذات مركز حليبي لامعة محدبة قطرها 5 مم.
3. مستعمرة بيضاء مصفرة ذات حواف مسننة بشكل بسيط قطرها 2.5 مم.
4. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها 6 مم.

زربه:

1. مستعمرة حليبية مسطحة غير لامعة ذات مركز شفاف مسننة الحواف قطرها 5.5 مم.
2. مستعمرة حليبية محدبة ذات مركز حليبي مرتفع عن سطح المستعمرة قطرها 4.5 مم.
3. مستعمرة شفافة محدبة لامعة قطرها 1.5 مم.

العزلات المعزولة في 18/9/08

مارع:

1. مستعمرة بيضاء مسطحة ذات مركز دائري قطرها 5 مم.
2. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها 5 مم.
3. مستعمرة بيضاء مصفرة مسطحة ذات حواف مسنة قطرها 2.5 مم.
4. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها 1 مم.

أتارب:

1. مستعمرة بيضاء مسطحة غير لامعة ذات مركزشعاعي قطرها 6 مم.
2. مستعمرة بيضاء مصفرة لامعة محدبة قطرها 1 مم.
3. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها 4 مم.
4. مستعمرة صفراء ذات حواف غير منتظمة ومركز لامع قطرها 3 مم.

الساعد:

1. مستعمرة حليبية مسطحة ذات حواف مسننة ومركز مسنن قطرها 5 مم.
2. مستعمرة بيضاء زغبية ذات مركز شعاعي قطرها 7 مم.
3. مستعمرة صفراء محدبة لامعة قطرها 2 مم.
4. مستعمرة حليبية مسطحة ذات قوام سميك قطرها 5 مم.
5. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها 1 مم.

العزلات المعزولة في 23/9/2008

كفر ناصح:

1. مستعمرة حليبية ذات منخفض مركز من قطرها4 مم.
2. مستعمرة حليبية ذات مركز شعاعي مسطح قطرها 6 مم.
3. مستعمرة صفراء باهتة لامعة محدبة قطرها 2 مم.
4. مستعمرة شفافة ذات حواف مسننة قطرها 6 مم.

كوكب:

1. مستعمرة حليبية محدبة لامعة قطرها4 مم.
2. مستعمرة شفافة مصفرة مسطحة ذات مركز شعاعي قطرها 6 مم.
3. مستعمرة حليبية مصفرة محدبة لامعة قطرها4 مم.
4. مستعمرة صفراء زغبية ذات حواف مسننة قطرها 6 مم.

السمرة:

1. مستعمرة حليبية شفافة مسطحة ذات حواف مسننة و مركز شعاعي قطرها 4 مم.

2. مستعمرة صفراء باهتة لامعة محدبة قطرها 1 مم.
3. مستعمرة حليبية لامعة محدبة قطرها 3 مم.

تلالين:

1. مستعمرة صفراء لامعة محدبة قطرها 2 مم.
2. مستعمرة حليبية لامعة محدبة قطرها 5 مم.
3. مستعمرة شفافة ذات مركز مسطح قطرها 8 مم.
4. مستعمرة شفافة حليبية محدبة لامعة قطرها 3 مم.

صوران(جباريه):

1. مستعمرة صفراء لامعة محدبة قطرها 2 مم.
2. مستعمرة حليبية غيرلامعة محدبة قطرها 4 مم.
3. مستعمرة شفافة حليبية مسطحة غير لامعة قطرها 5 مم.
4. مستعمرة شفافة مصفرة مسطحة غير لامعة ذات حواف مسننة و مركز مسنن قطرها9 مم.

Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection



Identification of Anastomosis Groups within Populations of *Rhizoctonia solani* Kühn affecting potatoes in Syria and Potential Measures for Management of the Disease it Causes

MSc Thesis in Agricultural Egineering
(Plant Protection)

By
Agr. Eng. Rania Haj Abdo

Supervised by

Dr. Bassam Bayaa
Professor in Plant Pathology
Fac. Of Agriculture
Aleppo University

Dr Abbas Abbas
Head Seed Quality Dept.
GOSM
Aleppo

2010 -2011